



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta biomedicínského inženýrství**

**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Stanovení alelických variant fenotypových antigenů na lidských  
erythrocytech krevně skupinových systémů metodou PCR**

**Determination of allelic variants phenotypic antigen on human red  
cells of blood group systems using PCR**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Ing. Ludmila Landová, Ph.D.

**Pilařová Lenka**

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2016/2017

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student: **Lenka Pilařová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Stanovení alelických variant fenotypových antigenů na lidských erythrocytech krevně skupinových systémů metodou PCR**  
Téma anglicky: Determination of allelic variants phenotypic antigen on human red cells of blood group systems using PCR

### Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :

Předmětem bakalářské práce bude stanovení alelických variant fenotypových antigenů na lidských erythrocytech krevně skupinových znaků u dárců krve pomocí kitu HEA BeadChip a metodu BioArray. V obecné části práce budou probrány jednotlivé krevně skupinové systémy dle nomenklatury ISBT, principy vyšetření těchto systémů v komparaci se serologickými metodami (manuálními i na imuno hematologickém analyzátoru) vzhledem k podávání transfuzních přípravků. Praktická část bude zaměřena přímo na in-vitro molekulární stanovení alelických variant fenotypových antigenů na lidských erythrocytech krevně skupinových systémů Rh (C, c, E, e, V, VS), Kell (K, k, Kpa, Kpb, Jsa, Jsb), Duffy (Fya, Fyb, GATA, Fyx), Kidd (Jka, Jkb), MNS (M, N, S, s, U, Uvar), Lutheran (Lua, Lub), Dombrock (Doa, Dob, Hy, Joa), Landsteiner-Wiener (LWa, LWb), Diego (Dia, Dib), Colton (Coa, Cob), Scianna (Sc1, Sc2) pomocí lidské genomové DNA se speciálním zaměřením na aplikaci v transfuzním lékařství.

### Seznam odborné literatury:

- [1] PECKA MIROSLAV, Laboratorní hematologie v přehledu, Buňka a krvetvorba, Český Těšín: tiskárna FINIDR, s. r. o., 2002, 160 s., ISBN 978-80-86682-01-3
- [2] PECKA MIROSLAV, Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy, ed. 1., Český Těšín: FINIDR, 2004, ISBN 80-86682-03-X
- [3] DANIELS G., Human Blood group, ed. 2., Blackwell Science, 2002, ISBN 0-632-056460
- [4] REID M., The Blood Group Antigen, Elsevier Academy Press, 2004, ISBN 0-12-586585-6

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: Ing. Ludmila Landová, Ph.D.

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 05.12.2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Stanovení alelických variant fenotypových antigenů na lidských erytrocytech krevně skupinových systémů metodou PCR vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 14.05.2017

.....

Pilařová Lenka

## **Poděkování**

V této části bych ráda poděkovala paní Ing. Ludmile Landové, Ph.D. za její odborné vedení při sepsání bakalářské práce. Za její cenné rady, trpělivost a objektivní přístup. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu na Oddělení hematologie a krevní transfuze UVN-VFN v Praze za jejich loajalitu, podporu při psaní a umožnění realizace praktické části bakalářské práce.

## **Abstrakt**

Tématem bakalářské práce je stanovení alelických variant fenotypových antigenů na lidských erytrocytech krevně skupinových znaků u dárců krve metodou bioarray (kit BioArray<sup>TM</sup>HEA BeadChip<sup>TM</sup> Immucor Norcross, GA).

V teoretické části je popsána historie hematologie, vývoj buněk červené krevní řady, je vymezen obor imunohepatologie, imunologická podstata interakce antigen-protilátka se zaměřením na krevně skupinové systémy.

V bakalářské práci je dále stručně popsána metodika vyšetřování alelických variant na erytrocytech dárců krve pomocí metody PCR včetně izolace DNA daného dárce. Systém „BioArray“ slučuje hodnoty analýzy obrazu (AISR) s dekódovací informační mapou kuliček dané šarže kitu a vypočítává fluorescentní intenzitu pro každý odpovídající krevně skupinový gen.

V praktické části bylo metodou bioarray vyšetřeno 15 dárců krevní skupiny 0 RhD<sup>-</sup> a 3 dárci krevní skupiny 0 RhD<sup>+</sup> (přednostní typování dárců s univerzální krevní skupinou 0RhD-pro urgentní podání transfúzních přípravků v případě vitální a statimové indikace). Tito dárci jsou opakovanými dárci plné krve, plasmy nebo trombocytů v UVN-VFN Praha nebo v odběrových střediscích náležících k UVN (Louny, Jilemnice, Mělník) a splňují kritéria jako dárci krve dle vyhláškyč. 304/2015 Sb.

## **Klíčová slova**

Krev; erytrocyt; vývojová stadia erytrocytu; imunohepatologie; krevní systémy; hemolytická onemocnění; PCR; Bioarray; molekulárně genetické metody; HEA BeadChip; výsledky.

## **Abstract**

The topic of the bachelor thesis is to determine the allelic variants of phenotype antigens on human erythrocytes of blood group features in blood donors by the bioarray method (kit BioArray <sup>TM</sup> HEA BeadChip <sup>TM</sup> Immucor Norcross, GA).

The theoretical part describes the history of haematology and the development of the red blood cells. The notion of immunohematology is defined as well as the immunological nature of the interaction antigen – antibody with focus on blood groups systems.

The bachelor thesis then briefly describes the methodology of examination of allelic variants on erythrocytes of blood donors by the PCR method including the isolation of DNA of the given donor. The “BioArray” system consolidates the advantages of picture analysis (AISR) with the decoding information map of beads of the given kit batch and it calculates the fluorescent intensity for each corresponding blood group gene.

The practical part contains examinations by the bioarray method of 15 blood donors with blood group 0 RhD- and of 3 blood donors with 0 RhD+ (preferential selection of donors with the universal blood group 0RhD- for urgent transfusion in case of life –sustaining indications or statim indications). These donors are repetitive donors of blood, plasma or thrombocytes in UVN-VFN in Prague or in transfusion centres belonging to UVN (in Louny, Jilemnice, Mělník) and they fulfil the criteria of blood donors according to the Decree N. 304/2015 Sb.

## **Keywords:**

Blood, erythrocytes, developmental stages of an erythrocyte, immunohematology, blood systems, haemolytic disorders, PCR, Bioarray, methods of molecular genetics, HEA BeadChip, results.

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav .....	10
2.1	Krev .....	10
2.2	Historie objevu červenýchrvinek .....	10
2.2.1	Erytrocyty (červené krvinky).....	11
2.2.2	Erytropoéza .....	12
2.3	Imunohematologie .....	14
2.4	Historie AB0 systému.....	17
2.5	AB0 systém .....	18
2.6	Rh systém.....	20
2.7	Kell systém.....	23
2.8	Duffy systém .....	24
2.9	MNSs systém .....	25
2.10	Kidd systém .....	26
2.11	Diego systém .....	26
2.12	Skupinový systém Dombrock .....	27
2.13	Skupinový systém Colton.....	27
2.14	Skupinový systém Landsteiner-Wiener (LW).....	28
2.15	Skupinový systém Lewis .....	28
2.16	Skupinový systém P .....	29
2.17	Skupinový systém Lutheran .....	30
2.18	Skupinový systém Scianna .....	30
2.19	Hemolytické onemocnění způsobené protilátkami.....	30

I.Akutní transfuzní reakce .....	31
II.Pozdní hemolytické reakce .....	31
3 Metody vyšetřování krevně skupinových systémů.....	35
3.1 Beadchip BioArray .....	40
4 Cíl práce.....	45
5 Metodika .....	46
6 Výsledky.....	55
7 Grafické znázornění výsledků .....	59
8 Diskuze .....	68
9 Závěr .....	72
10 Seznam použitých zkratk.....	73
11 Seznam použité literatury .....	77
12 Seznam použitých obrázků .....	83
13 Seznamu použitých tabulek .....	85



# 1 ÚVOD

Tématem bakalářské práce je stanovení alelických variant fenotypových antigenů na lidských erytrocytech krevně skupinových systémů metodou PCR. Stanovení krevních antigenů patří mezi základní předtransfuzní vyšetření dárce krve, společně s vyšetřením infekčních markerů (a-HCV, HBsAg, HIV a protilátek proti syfilis), screeningu antierytrocytárních protilátek, stanovením krevní skupiny včetně RhD a základního fenotypu (CcEeKkCw). V současnosti je prokázáno přibližně 329 antigenů a podle nomenklatury ISBT existuje více než 30 skupinových systémů. Tyto antigeny jsou stanovovány převážně manuálními metodami (na principu aglutinace) či automatizovanými serologickými metodami na imunohematologických analyzátoch. Ve světě se ale rozšiřuje mnoho moderních metod pro stanovení těchto erytrocytárních antigenů (BioArray metody (tzv. glass, liquid array, Luminex™ xMAP™ technologie, real-time PCR, sekvenace). V naší práci jsme se zaměřili na nejvíce se rozvíjející metodu stanovení alelických variant metodu tzv. chipování (Beadchip BioArray).

Teoretická část se věnuje krevním systémům, jejich antigenům a protilátkám, hemolytickým onemocněním a základní BioArray technologii. V praktické části je zhodnocen soubor dárců testovaný čipovou technologií, byly přiloženy jednotlivé výstupy z testovacího zařízení AIS a zobrazeny ukázky některých základních polymorfismů dárců ÚVN-VFN Praha.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Krev

Krev je speciální tkáň, která zajišťuje výměnu plynů, tvoří 7 % z celkové tělesné hmotnosti člověka, celkový objem je přibližně 4-5,5 l. [1] Odvádí z těla oxid uhličitý a odpadní produkty, které vznikají při látkové přeměně. Transportuje výživné látky, hormony, vitamíny, enzymy a protilátky, zároveň se podílí také na udržení stálého vnitřního prostředí. Obsahuje **část buněčnou**, která je zastoupena krevními destičkami, bílými krvinkami a červenými krvinkami, tato část je rozptýlena v tekuté krevní složce, tzv. **krevní plazmě**. Celulární část krve zaujímá 45 %, plazma 55 %. Ta obsahuje organické a anorganické látky, má mírně nažloutlou barvu a je slabě zásaditá. U dospělého člověka je objem plazmy asi 2,8-3,5 litrů. [2]

Nejvíce z **anorganických látek** je zde zastoupena voda, ionty sodíku a draslíku, vápník, hořčík, železo, kobalt, měď. Z **organických látek** pak plazmatické bílkoviny, sacharidy, složené lipidy, hormony, vitamíny, enzymy a dusíkaté látky, z **bílkovin** albumin, globulin a fibrinogen, přičemž albumin se podílí na udržení onkotického tlaku krve a váže ostatní látky jako vodu, bilirubin, hormony, pigmenty, mastné kyseliny a látky tělu cizí. Fibrinogen se účastní krevního srážení. [2]

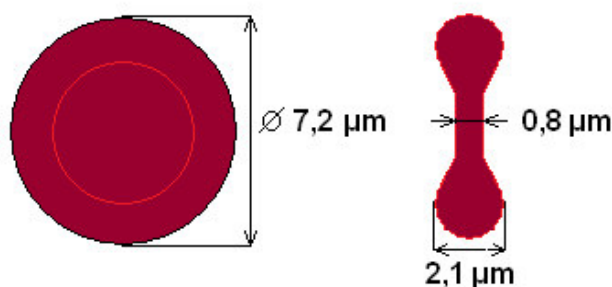
### 2.2 Historie objevu červených krvinek

V polovině 17. století Holanďan Anthony van Leeuwenhoek vydal svou vlastní studii o červených krvinkách, které mikroskopicky pozoroval v letech 1673-1675. Popsal jejich tvar a také vyslovil názor, že v kapilárách dochází ke změně jejich tvaru, s tím, že jde o jaderné buňky tzv. „*jaderné kuličky v séru*“. Rovněž komparoval různé tvary erytrocytů u ryb a savců. [3]

*„Pozoruje tuto krev byl jsem udiven, že částčky krve, které jsou kuličkami u člověka a savců a zbarvují krev červeně, jsou zde plochá a oválná tělíska nahuštěná v krystalické vodě...” [3]*

### 2.2.1 Erytrocyty (červené krvinky)

Erytrocyty jsou bezjaderné buňky, které během svého vývoje ztratily buněčné jádro. Mají bikonkávní tvar, díky kterému se zvětší jejich povrch a tím i místo pro navázání kyslíku a jiných dýchacích plynů. Tento tvar, který je deformovaný jim také umožňuje procházet mezi endotelovými buňkami při prostupu z krevní vlásečnice do krevního řečiště. Červené krvinky jsou vyplněny hemoglobinem.[1] Jejich průměr je přibližně  $7,2\mu\text{m}$  a šířka cca  $2\mu\text{m}$ . Fyziologické hodnoty červenýchrvinek se liší u mužů, žen i dětí. Odlišný počet je stanoven v závislosti na povrch těla, objemu tělních tekutin a obsahu železa v organismu. [4]



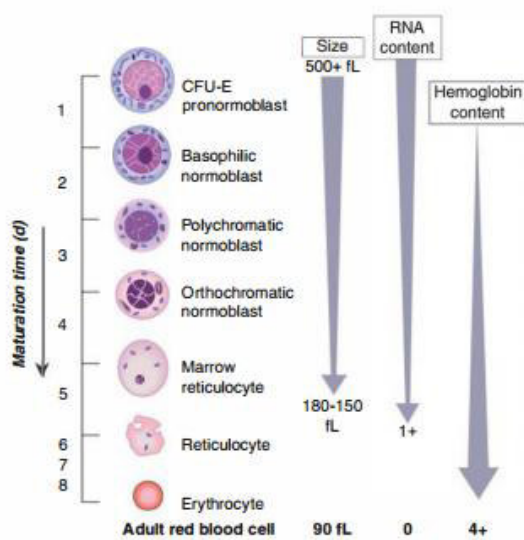
Obrázek 1 Erytrocyt [5]

*„V  $1\text{ mm}^3$  krve je kolem 4,3-5,3 milionů erytrocytů u muže a kolem 3,8-4,7 milionů u žen.” [4]*

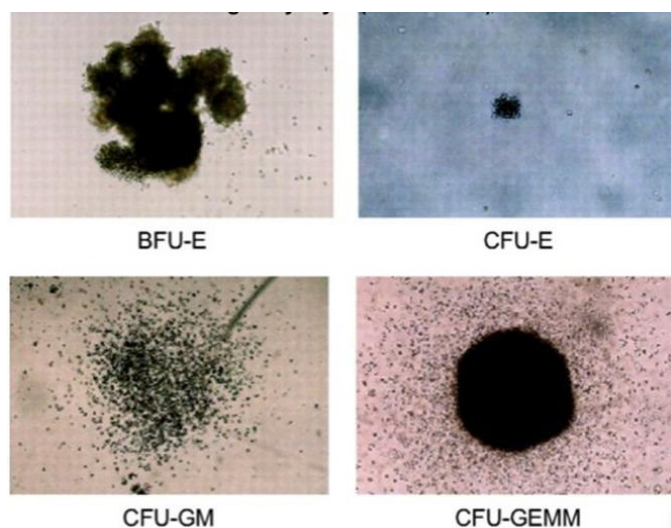
Erytrocyty nemají mitochondrie ani jádro, neprobíhá v nich klasický enzymatický metabolismus jako je např. znám u bílýchrvinek. Životnost červenýchrvinek v periferní krvi je přibližně 110-120 dní, poté erytrocyty podlehnou nitrocévnímu rozpadu či dojde k rozpadu v tkáňových makrofázích. [6]

### 2.2.2 Erytropoéza

Erytropoéza a zralé erytrocyty jsou označovány jako *erytron*. Zde je udržována dynamická rovnováha mezi zánikem a tvorbou erytrocytů. *Erythropoetin* je hlavní regulační protein erytronu. Základní buňkou erytronu je *progenitorová kmenová buňka* (BFU-E – *primitivní progenitor*), ta vyzrává v CFU-E – zralý progenitor. Jedná se o blasty s výběžky, výraznými nukleolami a vysokým cytoplazmatickým poměrem. Zatímco BFU je plně závislá ve svém růstu na SCF, IL-3, TPO a EPO, CFU je plně závislá na erythropoetinu.[7]



Obrázek 2 Vývojová stádia erytrocytu [9]



Obrázek 3 Základní kmenová buňka CFU GEMM a progenitory BFU-E a CFU-E [10]

### **Proerythroblast**

Je první rozlišitelnou buňkou vývojové řady pomocí mikroskopie. Vzniká z CFU-E pod vlivem erythropoetinu. Má velké jádro, jemnou chromatinovou strukturu, která obsahuje dvě až čtyři jadérka, která mají tmavší zbarvení než chromatin. [8] Velikost proerytroblastu je cca 15  $\mu\text{m}$ . Cytoplazma je sytě modrá, obsahuje vysoký obsah ribonukleové kyseliny.[12] V proerytroblastu je přítomen feritin jak volný, tak navázaný na siderozomy. Jádro zabírá více jak 80 % plochy buňky. [7]

### **Bazofilní erythroblast**

Velikost této buňky je 12-17  $\mu\text{m}$ . Je menší než proerythroblast. Má hrubší strukturu jádra bez nukleolů. Cytoplazma je opět sytě modrá, i když ne tak nápadná jako u proerytroblastu. S pokračujícím vývojem dochází ke zmenšování a ztmavnutí jader erytroblastů a postupně dochází ke změně barvy cytoplazmy od sytě modré po šedivou až růžovou barvu. Změnu barvy zapříčiňuje vzestupná koncentrace hemoglobinu a redukce ribozomálních komplexů.[7]

### **Polychromatofilní erythroblast**

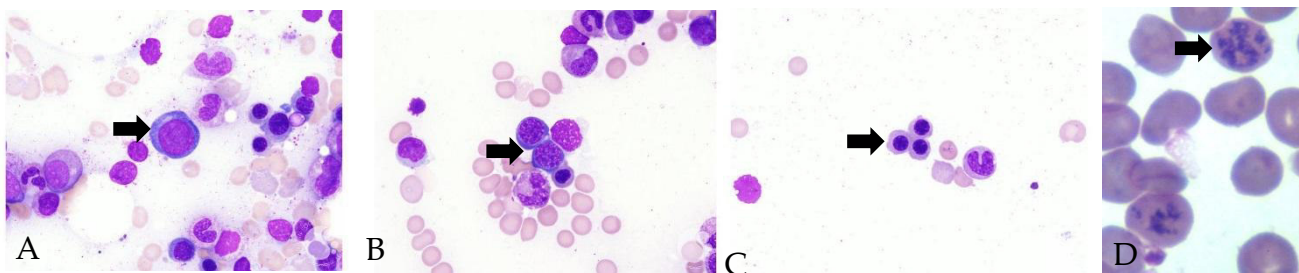
Je poslední buňka schopná dělení. Velikost této buňky je 12-15  $\mu\text{m}$ . Chromatin je hutný až hrudkovitý, neobsahuje jadérka.[8] Jádro je zhuštěno, cytoplazma má špinavě šedé zbarvení. [7]

### **Ortochromní erythroblast**

Je nejmenší kulatá až oválná buňka erytropoézy. Její velikost je 8-12  $\mu\text{m}$ . Buňky již nejsou schopny se dělit a jádro je velmi malé a kondenzované. Již zde neprobíhá syntéza DNA. Cytoplazma má růžové zbarvení.[7]

## Retikulocyt

Je bezjaderný krevní element, jde o tzv. mladý erytrocyt. Velikost této buňky je 7-9  $\mu\text{m}$ . U retikulocyty zůstávají v cytoplazmě zbytky některých organel např. ribozomů nebo endoplazmatického retikula. To je důvod proč retikulocyt může ještě slučovat hemoglobin. Obsahuje Substantia granulo-filamentosa, což jsou zbytky ribosomální RNA a mRNA. Tato substantia nejsou při běžném barvení viditelná. Např. barvení se brilantkreslovou modří zvýrazní vnitřní částičky, které obsahují ribonukleovou kyselinu. U méně zralých retikulocytů můžeme vidět síť ribonukleové kyseliny.[3] Fyziologické hodnoty retikulocytů u zdravého jedince jsou 0,5-1 % v krvi.[1] Retikulocyty během dvou dnů dozrávají v erytrocyty. [8]



Obrázek 4 proerythroblast, B – bazofilní erythroblast, C – ortochromní erythroblast, D - retikulocyt barvení A/B/C barvení Giemsa-Romanowski, D supravitalní barvení [11]

## 2.3 Imunohematologie

Imunohematologie se zabývá studiem a diagnostikou interakcí imunitního systému a krve, především detekcí antigenů krevních buněk a protilátek proti těmto antigenům. Objevení principů imunohematologie na začátku 20. století prolomilo imunitní bariéru pro krevní transfuzi a umožnilo rozvoj celého transfuzního lékařství a všech oborů s transfuzí souvisejících. Rutinní využití imunohematologických vyšetření spočívá v oblasti zajištění kompatibilních převodů transfuzních přípravků a v diagnostice, monitoringu a léčbě allo- a autoimunitních cytopenií. Do imunohematologických metod patří mimo jiné vyšetření krevních skupin a jejich zákonitostí, určení kompatibility krevních skupin mezi dárce a příjemcem atd.[13]

## Vymezení základních pojmů

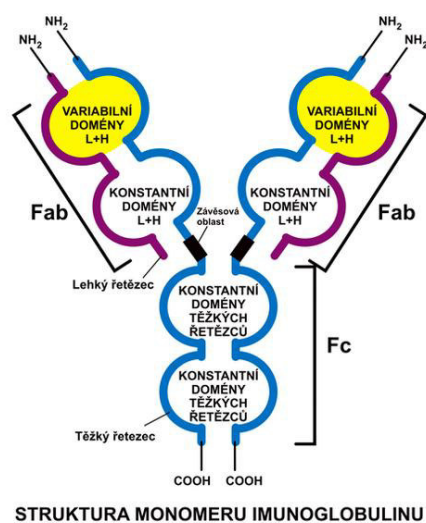
### 1/Antigeny

Antigeny vyvolávají imunitní odpověď, méně často bývají označovány jako **imunogeny**. Imunogen je kompletní antigen složený z nosiče, haptenu a epitopu. Vždy se jedná o makromolekuly, většinou bílkoviny. Na povrchu buněk a mikroorganismů se vyskytují nejčastěji jako glykoproteiny, někdy i jako polysacharidové struktury. Samotné lipidy tuto funkci nemají, mohou však zesilovat imunitní odpověď na antigen bílkovinný a působit tak coby adjuvans. Jako antigen mohou dokonce vystupovat deoxyribonukleová kyselina a jiné polynukleotidy. [14] Molekuly A, B a H jsou z imunologického hlediska antigeny, které stimulují u cizího organismu imunitní systém k tvorbě protilátek. [15] Na reakci antigenu s protilátkou se neúčastní celá molekula antigenu, ale jen některé její části, tzv. determinantní skupiny neboli epitopy. Jimi mohou být už zmiňované hapteny. [14] Hapten je nosič. Epitop je zodpovědný za vlastní imunogenitu antigenu. Nekompletní antigeny neobsahují epitopy a jsou tedy neimunogenní. Antigeny můžeme podle původu dělit do pěti skupin. Allogenní antigeny pocházejí od jiného jedince stejného druhu. Autologní mají původ v jednom jedinci. Isogenní jsou od jiného jedince se stejnou genetickou výbavou (př. jednovaječná dvojčata). Syngenní pocházejí z inbredních linií. Xenogenní jsou od jiného jedince jiného druhu. [15]

### 2/Protilátky

V 50. letech Edelman a Porter popsali detailní strukturu protilátek, strukturně se jedná o bílkoviny přesněji imunoglobuliny. Jejich molekulu tvoří 4 řetězce a to dva těžké, které se označují velkým písmenem H a dva lehké, které se označují velkým písmenem L. Řetězce jsou spojeny disulfidovými můstky mezi aminokyselinami cysteinu. Disulfidové vazby jsou i uvnitř řetězce a vytváří kruhové smyčky tzv. domény. Variabilní a konstantní doména je v řetězci L, těžké řetězce mají jednu

variabilní doménu a 3-4 konstantní. K reakci antigenu s protilátkou dochází na doméně variabilních řetězců lehkých i těžkých. K aktivaci komplementu slouží tzv. konstantní domény. [18] Podle struktury těžkých řetězců dělíme imunoglobuliny do tříd nebo izotopů. Každá třída má svoji biologickou funkci. Po vniknutí antigenu do organismu se jako první tvoří imunoglobulin M (IgM), teprve poté IgG. Při vazbě antigenu s protilátkou se vytváří imunokomplex, který je z organismu odstraněn. V sekretu i v plazmě se vyskytuje imunoglobulin A (IgA). IgD, jehož úloha zatím není zcela známá a Ig-E se účastní obranyschopnosti vůči parazitárním infekcím. [19]



Obrázek 5 Struktura imunoglobulinu [20]

Např. **protilátky proti antigenům krevních skupin** jsou imunoglobuliny, které mají specifitu proti antigenům jednotlivých typů krvinek. Buď se vyskytují přirozeně tzv. protilátky pravidelné, nebo je získáme (protilátky imunní). Přirozené protilátky jsou geneticky dané. Vyskytují se jako aglutininy v plazmě ve vysokém zastoupení, což umožňuje jejich vyšetření aglutinačním testem v iontovém prostředí (IgM). Získané protilátky vznikají na základě antigenního podnětu. Během života se setkáváme s antigeny, které jsou pro naše tělo cizí. Reagují na ně lymfocyty B a produkují specifické protilátky. Protilátky lze nalézt po transfuzi krve, transplantaci orgánů, umělé imunizaci a u některých těhotných. Jsou to



většinou imunoglobuliny IgG a jejich stanovení bývá obtížnější. Vyskytují se v plazmě v nižších koncentracích. Vyšetření jsou povinná před transfuzí a jako prevence vzniku hemolytické nemoci novorozenců (HON) a autoimunních hemolytických anémií. [13]

**3/Genotyp** je soubor pokynů kódovaných v souhrnu genetických informací uložených v sekvenci DNA. Tato informace se projeví (nebo neprojeví) jako znaky. Souhrn genetických informací určuje nejen vlastnosti daného organismu, ale i to, o jaký druh organismu se jedná. V přeneseném významu se pojem genotyp používá též pro druh rostliny nebo živočicha, zvoleného za typického představitele rodu.[16]

**4/Fenotyp** je soubor všech pozorovatelných vlastností a znaků živého organismu. Představuje výsledek spolupůsobení genotypu, epigenetiky a prostředí, čili to, jak organismus v daném znaku (znacích) nakonec skutečně vypadá. Obecně rozlišujeme znaky kódované, majorgeny, na jejichž projev ve fenotypu nemá prostředí žádný nebo téměř žádný vliv (barva očí, krevní skupiny, struktura bílkovin), a znaky kódované, minorgeny, na jejichž projev má prostředí vliv velký. [16]

## **2.4 Historie AB0 systému**

V roce 1901 objevil tři krevní skupiny A, B, C Karl Landsteiner (za tento objev mu byla udělena Nobelova cena v r.1930). Do historie se ale také zapsal český lékař Jan Jánský, který jako první popsal čtyři krevní skupiny podobným systémem jako Landsteiner. Ten předpokládal, že vlastnosti krve jsou založeny na přítomnosti či nepřítomnosti dvou aglutinogenů A a B a dvou protilátek –aglutininů anti-A a anti-B. Dokázal, že séra neobsahují protilátky proti svým vlastním antigenům. Skupinu, která má protilátky anti-A i anti-B, pojmenoval C.[21]

## 2.5 ABO systém

Systém ABO a určování krevní skupiny patří k nejstarším systémům. Určují ho 3 alelové geny na úseku 9. chromozomu-B, A a 0. Alely 0, A a B se navzájem kombinují, a to buď heterozygotně, nebo homozygotně. Fenotyp A vytváří vždy jeden genotyp AA nebo A0 ekvivalentně pro krevní skupinu B. Gen 0 se fenotypově projeví jen v homozygotní kombinaci. Určení krevní skupiny je vždy na základě přítomnosti chybějícího aglutinogenu. V krevním séru se vyskytují protilátky anti- A a anti-B. Reagujícím s antigenem A respektive B.[24]

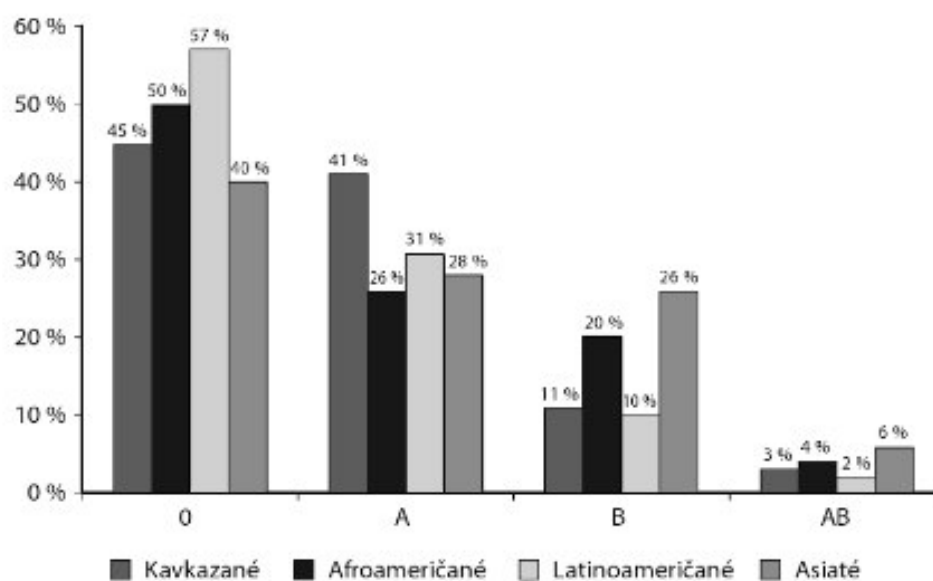
krevní skupina	ABO antigeny	ABO protilátky	ABO shodné erytrocyty	ABO kompatibilní erytrocyty
0	H	anti-A, anti-B	0	0
A	A	anti-B	A	A, 0
B	B	anti-A	B	B, 0
AB	A, B	žádné	AB	AB, A, B, 0

Obrázek 6 Tabulka ABO systému [22]

Podle přítomnosti různých antigenů na membráně erytrocytu je ISBT rozlišováno několik krevních systémů viz obr.[1]

SYSTÉM	ISBT SYMBOL	ANTIGENY	POČET ANTIGENŮ
AB0	AB0	A, B, AB <sup>1</sup> , A <sup>1</sup>	4
MNSs	MNS	M, N, S, s, U, Ena,...	38
P	P	P1	1
Rhesus	RH	D, C, E, c, e, C <sup>w</sup> , ...	45
Lutheran	LU	Lu <sup>a</sup> , Lu <sup>b</sup> , Lu4, ...	18
Kell	KEL	K, k, Kp <sup>a</sup> , Kp <sup>b</sup> , Js <sup>a</sup> , Js <sup>b</sup> , ...	21
Lewis	LE	Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup>	3
Dyffý	FY	Fy <sup>a</sup> , Fy <sup>b</sup> , Fy3, ...	6
Kidd	JK	Jk <sup>a</sup> , Jk <sup>b</sup>	3
Diego	DI	Di <sup>a</sup> , Di <sup>b</sup> , Wr <sup>a</sup> , Wr <sup>b</sup>	4
Cartwright	YT	Yt <sup>a</sup> , Yt <sup>b</sup>	2
Xg	XG	Xg <sup>a</sup>	1
Scianna	SC	Sm, Bu3, Sc3	3
Dombrock	DO	Do <sup>a</sup> , Do <sup>b</sup> , Gy <sup>a</sup> , Hy, Jo <sup>a</sup>	5
Colton	CO	Co <sup>a</sup> , Co <sup>b</sup>	3
Land/Wiener	LW	Lw <sup>a</sup> , Lw <sup>b</sup> , Lw <sup>ab</sup>	3
Chido/Rogers	CH/RG	Ch1, Ch2, Ch3, Rg1, Rg2, WH	9
Hh	H	H	1
Kx	XK	Kx	1
Gerbich	GE	Ge2, Ge3, Ge4, Wb	7
Cromer	CROM	Cr <sup>a</sup> , Tc <sup>a</sup> , Tc <sup>b</sup> , Tc <sup>c</sup> , Dr <sup>a</sup> , ...	10
Knops	KNOPS	Kn <sup>a</sup> , Kn <sup>b</sup> , McC <sup>a</sup> , Si <sup>a</sup> , Yk <sup>a</sup>	5
Indian	IN	In <sup>a</sup> , In <sup>b</sup>	2

Obrázek 7 Tabulka krevních systémů [23]



Obrázek 8 Zastoupení krevních skupin dle populace [22]

## **ABO antigeny**

H antigen je produkovaný H-transferázou nebo SE-transferázou, jde o výchozí látku pro další antigeny. Antigen H patří krevní skupině 0, jejímž produktem je 1,2-N-acetyl-galactosamyltransferáza, která přenáší N-acetyl-D-galaktosamin a uridin fosfát. N-acetyl-galaktosamin je dárce fukosylovaných galaktozylových zbytků. Dalšími antigeny jsou A, A<sub>1</sub>, které nalezneme u jedince s krevní skupinou A. U jedince s krevní skupinou A<sub>2</sub> nalezneme samotný antigen A<sub>1</sub>. U jedince s krevní skupinou B nalezneme antigen B. Oba antigeny A i B obsahuje krev jedince s krevní skupinou AB. [15]

## **Protilátky ABO systému**

Protilátky ABO systému jsou často označovány jako tzv. přirozené protilátky. Protilátky anti-A a anti-B – frekvence imunoglobulinů IgM, IgG, IgA. Některá komerční séra mohou obsahovat všechny tři třídy, přičemž anti-A a anti-B nestimulovaných jedinců jsou převážně IgM povahy. Mohou však obsahovat také IgG a IgA. Jedinci s krevní skupinou 0 mají ve svých sérech oba typy protilátek. [25]

## **2.6 Rh systém**

- Rh pozitivní (85 % populace)
- Rh negativní (15 % populace). Lidé, kteří jsou Rh negativní jsou homozygoti. [26]

Je rozpoznáno více jak padesát antigenů Rh systému. Mezi nejvýznamnější patří antigeny D, E, C, c a e. Přirozeně se protilátky proti systému nevytváří, aby je člověk získal, musí se imunizovat. [22]

## Dědičnost

Rh systém podléhá autozomálně dominantnímu typu dědičnosti a je umístěný na 1. chromozomu. Antigeny se dědí jako sada genů jednoho chromozomu. **Alely C/c, E/e a D/d** dávají vzniku 36 rozdílným genotypům. Pomocí protilátek rozeznáme jen 18 fenotypů, jelikož neexistuje sérum, které nám rozpozná anti-d. Nerozlišíme tedy homozygoty D/D a hemizygosity D/d. Také nemůžeme odlišit pozici cis u homozygota D oproti pozici C u heterozygota. Nejčastější haploidní genotypy jsou dce, dcE, DCE, Dce, DcE, DCE, dCe až Dce. Fenotypy R<sub>0</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>z</sub>, r, r', r'', r<sup>y</sup> mají upravené značení. Pokud je antigen D vyjádřený, značí se velkým R, malé písmeno r se použije, pokud antigen D chybí. V europoidní rase nalezneme spíše genotyp Dce/DCE nebo dCe/Dce nebo dce/DCE. Nejvíce pravděpodobný je však dce/DCE genotyp. Alely d/D, c/C a e/E jsou závislé na antigenech c, e, E, C a D. Dominantní je alela D, Ee a Cc jsou kodominantní.[22]

## Rh antigeny

Antigeny Rh systému jsou kódované genem RhC a RhD. Gen RhC kóduje antigeny c, e, C, E, kdežto RhD slouží pro expresi antigenu D. Geny RhD a RhC jsou tvořeny deseti exony a jsou z 94 % shodné. Na chromozomu jsou opačně orientované, což usnadňuje jejich párování v cis orientaci. Vzájemně je odděluje gen SMP1, který má nejasný význam. RhCE a RhD se nejvíce liší v intronu 4 nebo na intronech 2, 8. Proteiny RhCcEe a RhD mají odlišnost pouze v aminokyselinách. Rh asociovaný glykoprotein sice nenese antigeny, ale jeho přítomnost je nutná k expresi Rh antigenů. Antigeny Rh systému vytváří spolu s Rh asociovaným glykoproteinem celek. [22]

## Antigen D

RhD gen je kompletní, ale neúčinný u černochů, nekóduje tedy protein D ani jeho antigen. D negativní fenotyp může vzniknout pomocí hybridních genů. Vyjádření

antigenu D na erytrocytu je od nejsilnějšího po nejslabší. Nejslabší vyjádření je u DEL fenotypu. Lze jej rozdělit do dvou skupin slabý  $D^{\text{weak}}$  a varianty  $D^{\text{variant}}$ . [22]

### Antigeny C, c, E a e

Substance 4 aminokyselin proteinu RhCcEe-polymorfismus C/c. Při záměně pouze jedné aminokyseliny vzniká polymorfismus E/e. Vzácnější antigeny jsou  $E^w$  a  $C^u$ . [22]

### CE antigeny

Vznikají tehdy, když gen RhCE tvoří antigeny C a e, C a E, c a e nebo E a c. [22]

### Antigeny $C^w$ a $C^x$

Vznikají při změnách bílkoviny jako málo četné antigeny. C pozitivní jedinec bude mít pozitivní  $C^{w+}$  erytrocyty. [22]

<u>CDE nomenklatura</u> geny: CDE	<u>Wienerova nomenklatura</u> geny: R
CDe	$R_1$
cde	r
cDE	$R_2$
cDe	$R_0$
Cde	$r'$
cdE	$r''$
CDE	$R_z$
CdE	$r_y$

Obrázek 9 Komplexy Rh [23]

Antigen	Population (%)		
	English	Nigerian	Chinese
C	68	17	94
c	81	99	43
E	29	23	36
e	98	99	96

Obrázek 10 Procentuální zastoupení v populaci [25]

## Rh protilátky

Patří ke klinicky významným protilátkám. Mohou vznikat přirozeně, ale častěji vznikají imunizací při transfuzi nebo v těhotenství. Rh protilátky mohou vést k rozpadu krvinek, u podání neshodnému dárci, k hemolytickému onemocnění plodu a novorozence při jeho neshodnosti s Rh systémem matky. **Protilátky jsou většinou imunoglobuliny frakce IgG.** Jejich schopnost dobře reagovat bývá výraznější při použití erytrocytů upravených proteázami, po přidání enzymu do testu. Dobře reagují při 37 stupních. Lze je prokázat nepřímým antiglobulinovým testem. Nejčastější protilátky proti antigenům jsou anti-C, anti-D, anti-D, anti-E a anti-c. [22]

## 2.7 Kell systém

Byl objevený v roce 1946 a to pomocí antiglobulinového testu. Systém se skládá z 27 antigenů, který se číselně značí KEL1 až KEL27. Jedná se o glykoproteinový antigen, ačkoliv jeho funkce není známá. [25]

### Antigeny Kell systému

Antigeny tohoto systému se odlišují strukturou bílkovin. KEL1 a KEL2 jsou nejvýznamnější alely. V tomto systému se také vzácně nachází **nulový fenotyp K<sub>0</sub>**. Jedinci s fenotypem K<sub>0</sub> si mohou tvořit protilátku anti-K<sub>U</sub>, která reaguje se všemi antigeny, až na výjimku, kterou tvoří K<sub>0</sub>. Gen KEL se nachází na 7. chromozomu.

Při chybění antigenu XK jsou Kell antigeny velmi slabé. Po antigenu D se jedná o nejsilnější imunogeny. Nález anti-K představují dvě třetiny protilátek mimo Rh systém.[22]

KEL1 je v severní Evropě zastoupen okolo 9 %, necelé 2 % tvoří jedinci afrického původu a je vzácný u východních Asiatů. K antigenu KE1 je protikladný antigen KEL2, který se vyskytuje ve vysoké frekvenci KEL3 je zastoupen ze 2 % u bělochů. Nevyskytuje se u Afričanů a Japonců. Protikladný antigen je KEL4, který má vysoké zastoupení v populaci. [25]

### Protilátky

Protilátky Kell (IgG1) systému by měly být považovány za klinicky významné, protože mohou způsobit hemolytické onemocnění plodu a novorozence anebo hemolytickou transfuzní reakci. Pacienti by měli být s Kell-systémem protilátky antigenně negativní. [25]

## 2.8 Duffy systém

Antigeny jsou umístěné na glykoproteinu kódovaného genem Duffy. Exon 1 kóduje pouze prvních sedm aminokyselin glykoproteinu. [25] Skupinový systém Duffy tvoří protilátka proti antigenu  $Fy^a$ . Antigen  $Fy^b$  byl popsán téměř ve stejnou dobu jako antigen  $Fy^a$ , ten se častěji vyskytuje u bělochů. Černochům mohou tyto antigeny i chybět.[22]

Phenotype	Genotype		Frequencies (%)		
	Caucasian and Asian	African	Europeans	Africans	Japanese
$Fy(a+b-)$	$Fy^a/Fy^a$	$Fy^a/Fy^a$ or $Fy^a/Fy$	20	10	81
$Fy(a+b+)$	$Fy^a/Fy^b$	$Fy^a/Fy^b$	48	3	15
$Fy(a-b+)$	$Fy^b/Fy^b$	$Fy^b/Fy^b$ or $Fy^b/Fy$	32	20	4
$Fy(a-b-)$		$Fy/Fy$	0	67	0

Obrázek 11 Procentuální zastoupení v populaci [25]



## **Antigeny**

Antigeny systému Duffy se uplatňují při zánětlivé odpovědi organismu a jsou to receptory pro chemokiny. Na malarickou infekci se uplatňuje fenotyp Fy<sup>(b-a-)</sup>, který zajišťuje rezistenci červených krvinek (přírozená obranyschopnost). [22]

## **Protilátky**

Protilátky jsou málo časté. Přírozně vznikají pouze po imunizaci v těhotenství anebo transfuzí.[22] Protilátka anti-Fy<sup>a</sup> je častá, zatímco anti-Fy<sup>b</sup> je vzácná.[25]

## **2.9 MNSs systém**

Je vysoce komplexní krevní systém skládající se z 45 antigenů.[25]. Do systému MNSs patří antigeny M, N, S, U a s. Označují se jako sialoglykoproteiny, protože obsahují kyselinu sialovou. Chemicky patří antigeny MNSs systému ke glykoproteinům.[22]

## **Antigeny**

Antigeny produkují dva páry alelických genů. Alely mohou vytvářet glykoforin a to tehdy, když mají v jednom lokusu dvě homozygotní alely M nebo N.[22] M a N jsou protikladné a polymorfní antigeny.[25] Lokus Ss také umožňuje vzniku glykoforinu. Vzniká podle uspořádání aminokyselin antigenu s nebo S. Antigen U má vysokou frekvenci výskytu a může chybět na červených krvinkách Afroameričanů s genotypem S-s-U.[22]

## **Protilátky**

Protilátky systému MNSs patří k tzv.,, přírodním protilátkám''. Často bývá nalézána anti-M protilátka. Nepatří ke klinicky významným protilátkám a

nereagují při 37 stupních. Anti-S a anti-s jsou považovány za klinicky významné a uplatní se v potransfuzní reakci.[22]

## 2.10 Kidd systém

Je tvořen antigeny Jk<sup>a</sup> a Jk<sup>b</sup>, což jsou produkty alel s podobnými frekvencemi ve většině populace. Jk<sup>a</sup> značí kyselinu asparagovou a Jk<sup>b</sup> znamená asparagin na pozici 280 v glykoproteinu Kidd. Protilátky Kidd systému jsou nebezpečné, protože mohou vyvolat okamžité a závažné HTR. Často nejsou včas detekovány vzhledem k jejich tendenci klesat na nízké nebo nedetekovatelné hladiny v krevní plazmě.[25] Antigeny jsou velmi imunogenní a jsou také součástí leukocytů, ledvin, mozku a srdce.[22]

Antigen	Frequencies (%)		
	Europeans	Africans	Asians
Jk <sup>a</sup>	76	92	73
Jk <sup>b</sup>	72	49	76

Obrázek 12 Procentuální zastoupení v populaci [25]

### Protilátky

Protilátky krevního systému Kidd (IgG i IgM) nejsou tak časté, ale jsou velmi nebezpečné. Bývají při fagocytóze rychle odstraňovány z krevního řečiště a nemusí být správně detekované při předtransfuzním vyšetření. Rychlá odpověď imunitního systému může také vést k akutnímu rozpadu červených krvinek po podání transfuze. Protilátky mohou též aktivovat komplement.[22]

## 2.11 Diego systém

Je systém s více antigeny, které jsou různě zastoupené v populaci.[22] Skládá se z 21. antigenů. Ke známým antigenům Diega systému patří Di<sup>a</sup> nebo antigeny

Wright.[22] Antigen  $D_i^a$  se nachází výhradně u původních obyvatel Latinské a Severní Ameriky, dále pak ve východní a centrální části Asie. Dědí se jako dominantní znak. Antigeny  $D_i^b$  a  $D_i^a$  jsou imunní vůči působení trypsinu, pronázy, papainu a proti některým chemickým látkám. [27]

### **Protilátky krevního systému Diego**

Protilátky anti- $D_i^a$  a anti- $D_i^b$  jsou vyjádřené při narození. Protilátka anti- $D_i^a$  může způsobit akutní potransfuzní reakci a je zodpovědná za hemolytické onemocnění novorozence. [27]

### **2.12 Skupinový systém Dombrock**

Systém Dombrock se skládá z pěti antigenů. ( $Do^a$  a  $Do^b$  a vysokofrekvenční antigeny  $Gy^a$ ,  $Hy$  a  $Jo^a$ ).[25] Protilátky bývají jen vzácně příčinou potransfuzní reakce a jsou obvykle ve směsi s jinými protilátkami.[22] Protilátka anti- $Gy^a$  je charakteristicky produkována jedinci imunizovaných fenotypu Dombrock-nula. [25]

### **2.13 Skupinový systém Colton**

Systém Colton zastupují antigeny  $Co^a$  a  $Co^b$ . Vzácně lze prokázat antigen  $Co^3$ . [22] Antigen  $Co^a$  je vysokofrekvenční a  $Co^b$  je jeho protikladný antigen. Vyskytuje se u bělochů asi v 8 %, ale v nižším zastoupení u etnických skupin. Anti- $Co^3$  reaguje se všemi červenými krvinkami s výjimkou těch extrémně vzácných, které obsahují fenotyp Colton-nula. Protilátky byly prokázány u těžkého HDFN a u HTR.[25] V AGH testech najdeme reagující protilátky.[22]

## 2.14 Skupinový systém Landsteiner-Wiener (LW)

Je tvořený protikladnými antigeny LW<sup>a</sup> a LW<sup>b</sup>. Anti-LW<sup>ab</sup> reaguje se všemi červenými krvinkami s výjimkou těch velmi vzácných fenotypů. Protilátky LW systému nejsou považovány za klinicky významné. [25]

## 2.15 Skupinový systém Lewis

Byl objeven spolu se svojí protilátkou anti-Le<sup>a</sup>. Skupinový systém je tvořený dvěma antigeny Le<sup>a</sup> a Le<sup>b</sup>, které jsou na 19.chromozomu.[22]

geny	fenotyp
<i>Le, se, H</i>	Le(a+b-)
<i>Le, Se, H</i>	Le(a-b+)
<i>le, se, H</i>	Le(a-b-)
<i>le, se, hh</i>	Le(a-b-)

Obrázek 13 Geny a fenotypy systému Lewis [22]

Lewis antigeny jsou sacharidové struktury a na rozdíl od ostatních antigenů nejsou produkovány erytroidními buňkami.[25] Antigeny jsou syntetizované specifickou transferázou, která připojuje k prekurzorovému řetězci monosacharid fukózu. Aby nám vznikl antigen krevního systému Lewis, vyžaduje to geny Se,H a Le. Produktem reakce je antigen Le<sup>a</sup>, který je vstřebáván z plazmy na membránu červených krvinek. Tím se získá fenotyp Le<sup>(b-a+)</sup>. Le<sup>b</sup> antigen může vzniknout na erythrocytech, což vede k tomu, že získají opačný fenotyp a to Le<sup>(b+a-)</sup>. V systému Lewis se vyskytují další antigeny a to Le<sup>x</sup> a Le<sup>y</sup>. Novorozencům chybí antigeny Lewis, buď úplně, nebo jsou při narození. Slabé změny Lewis antigenů a ABH mohou souviset s maligními nemocemi. [22]

## Protilátky

Protilátky anti-Le<sup>b</sup> a anti Le<sup>a</sup> se vyskytují převážně u osob s fenotypem Le<sup>(a-b-)</sup>. U těhotných žen se také můžeme setkat s protilátkami, nebývají ale příčinou HON. Protilátka anti-Le<sup>Bh</sup> je taková, která může reagovat s erytrocyty 0Le<sup>b+</sup> a A<sub>2</sub>Le<sup>b+</sup>. Nemůže reagovat s erytrocyty A<sub>1</sub>Le<sup>b+</sup>. Protilátky dobře reagují při pokojové teplotě, při 37 stupních nejsou aktivní.[22]

### 2.16 Skupinový systém P

Antigeny systému P jsou strukturou podobné antigenům ABO, Lewis a Ii jsou syntetizovány transferázami a to tak, že k základnímu prekurzorovému substrátu adují monosacharid. Patří sem antigeny P<sup>k</sup>, P a P<sup>1</sup>, které je prakticky přítomné na všech krvinkách. Pozitivní antigen P<sup>1</sup> má na červených krvinkách antigen P a P<sup>1</sup> je přibližně 80 % v populaci. Pokud mají červené krvinky pouze antigen P, tak jsou to fenotypově P<sup>2</sup> jedinci. P<sup>1</sup> a P<sup>k</sup> pozitivní jedinci mají vzácný fenotyp a to P<sup>1k</sup>. Vyjádření antigenu P<sup>1</sup> je silnější u homozygotů P<sup>1</sup> pozitivních než u heterozygotů, je to ale také velmi individuální, záleží totiž na genetické dispozici jedince. V jiných tkáních, leukocytech, sekretech i v plazmě může být přítomný antigen P, který je buněčný receptor pro bakterie, pro parvovirus B19 a účastní se adheze buněk.[22]

## Protilátky

Protilátky anti-P<sup>1</sup> jsou imunoglobuliny M a bývají aktivní jen při nízkých teplotách. Nemají příčinu při hemolytické nemoci novorozence, jen někdy jsou vzácně spojovány s potransfuzními komplikacemi. Protilátku anti P<sup>1</sup> nacházíme ve spojení s protilátkami anti-IP nebo anti-IP<sub>1</sub>. Význam má autoprotílátka anti-P, která hemolyzuje erytrocyty jako imunoglobulin G. U pacientů s autoimunitním hemolytickou anémií může způsobit těžkou hemolýzu.[22]

## **2.17 Skupinový systém Lutheran**

Lutheran je složitý krevní systém, který obsahuje přibližně 19 antigenů včetně čtyř protikladných dvojic jako jsou  $Lu^a/Lu^b$ ,  $Lu6/Lu9$ ,  $Lu8/Lu14$  a  $Au^a/Au^b$ . Homozygoti  $Lu$  genu jsou neaktivní, heterozygoti mají nezávislou dominantní regulaci genu. Regulují expresi několika dalších antigenů včetně  $P1$ ,  $IN^b$  a  $AnWj$ . [25] Po narození jsou antigeny slabě vyvinuté a sílí s přibývajícím věkem. [22]

### **Protilátky**

Nejsou považovány za klinicky významné. Nejčastěji to jsou imunoglobuliny  $M$ . Málo se vyskytují a lépe reagují při nižších teplotách. [22]

## **2.18 Skupinový systém Scianna**

Skupinový systém Scianna se skládá z dvojic protikladných antigenů. S nízkými a vysokými výskyty antigenů  $Sc1$  a  $Sc2$ . Antigeny o velmi vysoké frekvenci jsou  $Sc3$ . [15]

### **Protilátky**

Systémové protilátky jsou velmi vzácné. Nejlépe reagují pomocí antiglobulinových testů jako např.  $Sc1$  přímou aglutinací [15]

## **2.19 Hemolytické onemocnění způsobené protilátkami**

Vzhledem k odlišnému zaměření naší práce uvádíme pouze přehled těchto onemocnění.

**Potransfuzní reakce:** Jsou nežádoucí účinky po podání transfuze. Především tato reakci je možné správným postupem/správnou laboratorní praxí. [24]

## **Typy transfuzních komplikací**

- Akutní reakce (do 24 hodin)
- Pozdnější reakce (po dnech, týdnech nebo měsících)[24]

## **I. Akutní transfuzní reakce**

### **1/Akutní hemolytická reakce**

- Projeví se po podání nekompatibilní krve dárce s příjemcem.
- Možné příznaky jsou prudká bolest za hrudní kostí a v lumbální oblasti, horečky, zimnice, hypotenze, studený pot, úzkost, pocit na zvracení a psychická dezorientace.[24]

### **2/Nehemolytická transfuze-pyretická reakce**

- Nastává při imunizaci příjemce antigenními leukocyty od dárce a vytvoří se antileukocytové protilátky. Reakce se projeví 30-120 minut po podání transfuze a vyvolává tři typy horeček (lehkou, střední a těžkou).
- Možné příznaky jsou bledost, bolest hlavy, nevolnost, zvracení, hypotenze a tachykardie. [24]

### **3/Alergická reakce**

### **4/Septický šok**

### **5/Akutní poškození plic (TRALI)**

### **6/Objemové přetížení**

### **7/Komplikace masivních transfuzí**

## **II. Pozdní hemolytické reakce**

### **1/Potransfuzní purpura**

### **2/Přenos infekčních nemocí**

### 3/Reakce štěpu proti hostiteli

### 4/Hemolytické onemocnění novorozence

První záznam se datuje od 17. století. Je to nemoc plodu a novorozence, při níž erytrocyty přežívají kratší dobu. Je příčinou vážného fetálního a novorozeneckého onemocnění a úmrtnosti. Onemocnění vystihuje hemolýza imunitního typu, při němž dochází k navázání mateřských protilátek na antigeny fetálních a novorozeneckých červených krvinek a následně dochází k jejich rozpadu. Plod, který má antigen zděděný po otci, může imunizovat matku.

Mezi nejčastější antigeny navozující imunitní reakci patří antigeny skupiny **Rh a také antigen K**. K imunitní reakci může dojít i při neshodě ABO antigenů. V dalším kroku se protilátky dostávají do krevního řečiště plodu a ničí jeho erytrocyty. Imunitní odpověď u HON je tvořena **dvěma fázemi**. V první fázi dojde ke kontaktu cizího erytrocytárního antigenu, k rozpoznání a imunitní systém matky začne vytvářet protilátky. Nejprve se tvoří imunoglobuliny M, poté IgG. Tato tvorba se označuje jako *primární imunitní odpověď*. Při opakovaném těhotenství je imunitní odpověď rychlejší a tvoří se imunoglobuliny G, které mají imunologickou paměť. Tato reakce je známá jako *sekundární imunitní odpověď*. [22]. Při proniknutí imunoglobulinu G do krevního řečiště plodu dojde ke zkrácení životnosti jeho erytrocytů. U plodu může v těžkých případech zapříčinit špatné prokrvení a vyvolat až edém plodu. Po porodu je dítě ohroženo vysokou hladinou nekonjugovaného bilirubinu, který se nemůže konjugovat. Ke konjugaci nemůže dojít z důvodu nezralosti jater novorozence. Nekonjugovaný bilirubin může projít přes hematoencefalitickou bariéru a poškodit mozek dítěte. Tato komplikace ale nastává u velmi vážných případů. [2]



Hemolytické onemocnění novorozence dělíme podle protilátek do třech skupin:

#### **Rh HON**

- při neshodnosti v Rh antigenech-většinou se vyskytuje Rh D
- výjimečně při první graviditě
- onemocnění roste s počtem těhotenství a porodů
- postihuje děti dalšího těhotenství[22]

#### **ABO HON**

- při neshodnosti krevní skupiny matky a novorozence
- časté u žen krevní skupiny 0(mají protilátky anti-A i anti-B)
- onemocnění není závislé na opakovaném těhotenství [22]

#### **HON jiných krevně skupinových systémů**

- onemocnění proti protilátkám krevního systému Kell
- projevem je těžká anémie
- antigeny krevního systému Kell působí na předchůdce erytrocytů v kostní dřeni a vedou k jejich zničení
- většinou vzniká díky podané transfuzi K<sup>+</sup> erytrocytů. (ženám a dívkám se podává K negativní erytrocyty)[22]

#### **Prevence hemolytického onemocnění novorozence**

Velmi úspěšnou a rozšířenou metodou je podávat anti-D imunoglobulin. Podává se všem ženám, které jsou RhD negativní a porodily Rh pozitivní dítě. V některých případech se protilátka podává i během těhotenství. Podaná protilátka potlačuje imunitní odpověď organismu. Anti-D se podává intravenózně nejpozději do 72 hodin po nekomplikovaném porodu. [22]

## **5/Autoimunitní hemolytické anémie (AIHA)**

Jsou to onemocnění, která postihují autoprotilátky proti erytrocytům. Autoprotilátky se váží na antigeny exprimované na povrchu erytrocytů. Erytrocyty jsou dále lyzovány aktivovanými monocyto-makrofágovým systémem nebo komplementem. Rozpad erytrocytů může probíhat v krevním řečišti za účasti komplementu nebo mimo krevní řečiště a to fagocytózou v monocyto-makrofágovém systému. Rozlišujeme AIHA primární a sekundární. Výskyt tohoto onemocnění bývá 1 případ na 100 000 obyvatel s vyšším zastoupením u žen. [28]

### 3 METODY VYŠETŘOVÁNÍ KREVNĚ SKUPINOVÝCH SYSTÉMŮ

#### Sérologické techniky

Jsou techniky založené na principu hemaglutinace. Jako standardní reagentie se používají monoklonální IgM antiséra, která jsou dostupná na současném trhu a využívají se pro otypování mnoha antigenů. Nevýhodou serologických technik je, že nereagují se všemi epitopy antigenů. Díky této nevýhodě může být výsledek falešně pozitivní nebo negativní, především při testování antigenů Rh systému. Polyklonální séra typu IgG se používají pro rozšířené testování více antigenů. Ty se uplatňují především při použití nepřímého antiglobulinového testu (NAT). Slabé formy antigenů a většina variantních antigenů se stanovují pomocí polyklonálních antisér. Nemohou se ovšem uplatnit v případě positivity přímého antiglobulinového testu (PAT). Testování velmi komplikuje i to, že některé antigeny nemají ani dostupná certifikovaná antiséra. Další velkou nevýhodou je testování antigenů u transfundovaných osob. V těchto případech se setkáváme s výsledkem přítomnosti dvojí populace červených krvinek a je obtížné odlišit antigeny dárce od antigenů pacientových.

Nejčastěji používanými metodami jsou testy **pevné fáze a zkumavkové testy dále metody gelové aglutinace**. Kromě testování ve zkumavkách je většina metod dostupná jak v manuální, tak v automatizované formě. [29]

#### Molekulárně genetické metody

Principem molekulárně genetických technik je analýza DNA. Mezi metody patří polymerázová řetězcová reakce neboli PCR, microarray, bioarray, rozlišení pomocí primerů a rozlišení pomocí sond: real-time PCR. Používá se u dárců krve, příjemců transfuzních přípravků a u vyšetření hemolytického onemocnění plodu. [30]

- Výhodou molekulárně genetických technik je, že umožňují stanovit slabé a variantní antigeny, tzv. otypovat pacienty po transfuzích a neinvazivně stanovit některé krevní skupiny plodu. [30]
- Nevýhodou technik bývá to, že vyžadují speciální prostory, přístroje a specializované pracovníky. Mnoho testů není certifikovaných a u jedinců s chimérismem bývají nespolehlivé výsledky. [30]

### **Polymerázová řetězová reakce**

Byla popsána v roce 1983 Kary Banksem Mullisem, který za tento objev získal Nobelovu cenu. Polymerázová řetězová reakce je amplifikační metoda, která slouží k namnožení i malého množství DNA. Úseky DNA jsou kopírovány a syntetizovány pomocí DNA-polymerázy. Polymeráza musí být odolná vůči změnám tepla a syntetizuje DNA pomocí templátu, který je ve formě jednořetězové DNA na principu shodnosti bází. Aby reakce proběhla, je potřeba dvou primerů. Ty se připojí ke komplementárním úsekům protilehlých řetězců DNA. Primery také vymezují úsek DNA, který budeme množit. Jako předloha slouží řetězce dsDNA, pro tuto reakci se používá přístroje – thermocycleru. Ten udržuje různé teploty a cyklicky opakuje kroky reakce.[31] Polymerázová řetězová reakce trvá přibližně 2,5-3 hodiny. Během tohoto času je molekula DNA exponenciálně namnožena. PCR reakce se kontroluje elektroforeticky. K jejím výhodám patří, že nepotřebujeme mnoho vzorku, rychlost a specifčnost reakce. Musíme si dávat pozor na kontaminaci cizí DNA, která by nám mohla vyvolat falešnou pozitivitu reakce. [32]

## **Přehled molekulárně biologických metod pro stanovení krevně skupinových znaků**

### **1/techniky s nízkou účinností (Low-throughput techniky)**

Jsou vývojově nejstarší, ale nejvíce používané a rozšířené. Vyznačují se finanční efektivitou a vysokou robustností. Od mnoha dodavatelů jsou na trhu dostupné komerční kity např. analyzátor FluoVista pro systém FluoGene. [33]

Metody mají základ v polymerázové řetězcové reakci, následně pak dochází k vizualizaci jejich produktů, které jsou separované na základě rozdílnosti délky fragmentů pomocí gelové elektroforézy. Ethidium bromid se používá jako barvivo pro vizualizaci fragmentů. Do těchto metod dále spadají metody „**Alelově specifická PCR**“ (AS-PCR) a „**Polymorfismus délky restričních fragmentů**“ (Restriction fragment lenght polymorphism, RFLP). AS-PCR je častěji nazývána jako metoda, která používá **sekvenčně-specifických primerů** (sequence-specific primering, PCR-SSP)

PCR-RFLP rozeznává přesně danou oblast DNA pomocí aktivace restričních enzymů. PCR-SSP je založena na sekvenci specifických primerů, které nasednou na oblast, v níž je lokalizovaný hledaný SNP. Výsledný PCR produkt vznikne jen tehdy, když je ve vyšetřované DNA přítomný SNP. [34]

### **2/Techniky se střední až vysokou účinností (Medium to high-throughput techniky)**

Tyto techniky mají společný znak a to možnost hromadného testování více SNP najednou. [34]

### **3/PCR v reálném čase (real-time PCR)**

Tato metoda umožňuje sledovat daný úsek DNA v reálném čase. Každý cyklus reakce je zaznamenán. Používají se sondy, které využívají principu fluorescence a zaznamenávají amplifikaci. Sondy se specificky nebo nespecificky váží na úsek DNA, který amplifikujeme. Reakce probíhá v termocykleru, ten je vybavený specifickým optickým zařízením, které snímá intenzitu fluorescenčního záření. To je zaznamenáno a zpracováváno specifickým softwarem pomocí matematických metod.[34]

### **3/ Beadchip array viz kapitola 3.1**

### **4/ Glass array (microarray)**

Tato metoda má vysokou účinnost a je také známá jako analýza na sklíčku. Je možné zanalyzovat velké množství genů během jedné série, a tak získat velké množství informací. Úseky vyšetřované DNA jsou namnoženy a fluorescenčně označeny. Poté jsou přeneseny na microarray sklíčko, na jehož povrchu jsou oligonukleotidové sondy. Na jednom čipu může být umístěno až několik stovek tisíc sond specifických vůči různým úsekům DNA. K vazbě označeného ampikonu dojde v případě, že vyšetřovaná DNA obsahuje komplementární sekvenci oligonukleotidů, které jsou připevněné na sklíčku. Fragmenty, které se nenavázaly jsou vymyty. Ve scanneru probíhá detekce a výsledný obraz je pomocí softwaru interpretován. [34]

### **5/ Liquid array**

Tyto techniky jsou založené na Luminex systému, který využívá Xmap technologii a jsou známy jako tzv. Kapalinové metody. [34]

Cílová oblast vyšetřované DNA je namnožena pomocí polymerázové řetězcové reakce s použitím deoxycytidinu trifosfátu. Výsledné amplikony nasedají na oligonukleotidové próby připojené k polystyrénovým mikrokuličkám různých barev. Každá mikrokulička má rozměr 5,6  $\mu\text{m}$ . Pokud se jedná o superparamagnetické kuličky Magplex™ může mít i 6,5  $\mu\text{m}$ . Uvnitř kuliček jsou v přesném poměru přítomny dva typy fluoroforů (červený a infračervený). Rozdílné zastoupení fluoroforů umožňuje vznik 100 unikátních spektrálních podpisů mikrokuliček, které jsou pomocí detekčního systému Luminex Xmap rozpoznány. [35]

Biotynylovaný amplikon je navázán k próbě a vizualizován pomocí streptavidinu-konjugovaného s fykoerythrinem. V přístroji Luminex jsou analyzovány mikrokuličky, které jsou porovnávány na základě fluorescenčního signálu barvy mikrokuličky s přítomností či nepřítomností signálu fykoerythrinu. Luminex využívá dva lasery a pracuje na principu průtokového cytometru. Zelený laser neboli „assay“ laser excituje fykoerythrin a červený (solid state) „klasifikační“ laser excituje barvu uvnitř mikrokuliček a určuje tak jejich typ. [36]

## **6/Sekvenace**

Sekvenování je založeno na Sangerově metodě a probíhá ve čtyřech nezávislých reakcích. Reakční směs obsahuje primery, templát, DNA polymerázu, radioaktivně či fluorescenčně značené deoxynukleotidy (dNTP) a 2', 3'- dideoxynukleotidy (ddNTP). Každá ze čtyř reakčních směsí obsahuje ddNTP – ddATP, ddTTP, ddCTP nebo ddGTP, který je charakteristický a znemožňuje vznik vazby mezi ním a dalším nukleotidem. V nízké koncentraci jsou ve směsi obsaženy dideoxynukleotidy, aby mohla zároveň probíhat i klasická syntéza DNA. Výsledkem sekvenace jsou části DNA o různé délce zakončené značenými dideoxynukleotidy. Tyto části jsou denaturovány a roztrženy podle

velikosti elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Po ozáření vzniká obraz s typickými proužky, z kterých lze odvodit sekvenci DNA. Novější úprava, kapilární elektroforéza, umožňuje sekvenci v jedné reakci. Primer popřípadě ddNTP je značen jiným fluorescenčním barvivem a elektroforéza probíhá v jedné skleněné kapiláře. Pyrosekvenace je založena na práci 4 enzymů a byla úspěšně použita pro detekci některých erytrocytových antigenů, v současné době je ale omezena jen na vyšetření několika systémů krevních skupin zahrnující Duffy, Kell a Kidd. [37]

## **7/Sekvenování nové generace (Next generation sequencing, NGS)**

Tuto metodu lze rozdělit do dvou skupin.

- První představují technologie založené na PCR amplifikaci templátu a zahrnují platformy: Roche 454 System, Illumina sequencers, AB SOLiD Systém a Ion Personal Genome Machine.
- Druhou skupinu tvoří technologie, u kterých nedochází k pomnožovacímu kroku před vlastní sekvenací. Největší výhodou sekvenování nové generace je schopnost detekovat nové alely nebo neznámé mutace vztahující se ke kódujícím regionům. Další výhodou je možnost detekovat raritní genotypy jako např. Lan-nebo Jr<sup>(a-)</sup>. [34]

### **3.1 BeadchipBioArray**

Tato metoda je založena na tzv. synteticky vyráběných kuličkách s navázanými specifickými sondami pro dané alely krevně skupinových systémů, které využívají PCR produkt jako matrici.

Tyto kuličky mají v průměru 3 µm a každá nese jinou barvu, představují jednu alelu krevně skupinového systému, např. modrá kulička představuje Fy<sup>b</sup>, červená Fy<sup>a</sup>, zelená Jk<sup>a</sup>, fialová Jk<sup>b</sup>. Při výrobě čipu dochází ke smíchání kuliček a následně

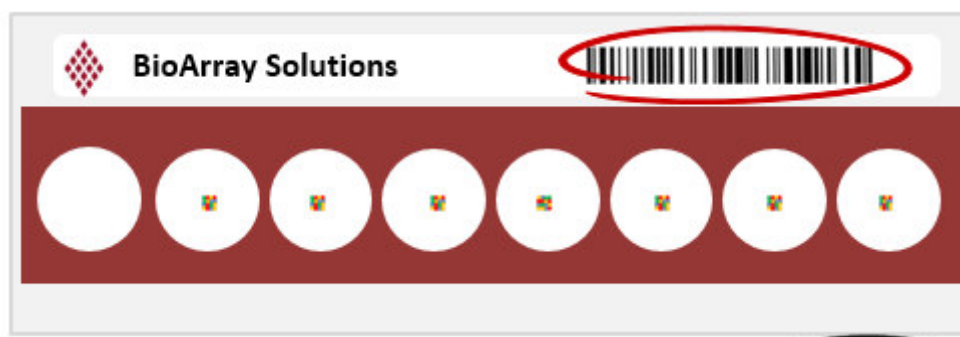


se rovnoměrně rozptýlí po křemíkové destičce. 4000 a víc náhodně rozptýlených kuliček obsahuje čip o rozměrech 300  $\mu\text{m}$  x 300  $\mu\text{m}$ . Poté je destička rozřezána na jednotlivé čipy, které se nalepí na skleněný nosič (podložní sklíčko), každý nosič má svůj unikátní čárový kód. V konečné fázi je využito přístroje AIS, který fluorescenční detekcí sejme všechny barvy kuliček (sond) v beadchipu. Dekódovací soubor pro každý čip je dodáván na CD a je v něm zabudovaná „mapa kuliček“. [38]

V prvním kroku reakce jsou pomocí polymerázové řetězcové reakce namnoženy oblasti genů zahrnující vyšetřované polymorfismy. Poté dojde k odmytí nespecifických struktur (zbývajícího primeru a dNTPs) a k rozštěpení dsDNA na ssDNA, která je aplikována na Bead-čip. Na povrch každé kuličky jsou specifické oligonukleotidové sondy. K vazbě dochází, pokud vyšetřovaná DNA obsahuje sekvenci shodnou k oligonukleotidové sondě. Následuje elongační reakce se značenými nukleotidy. Pokud je přítomna navázaná DNA, syntetizuje se k ní shodné vlákno. Elongační reakce nukleotidů neproběhne v případě, že nedošlo k navázání vyšetřované DNA na sondu. Pomocí 5-karboxytetramethylrhodaminu jsou značeny nukleotidy. Ty fluoreskují po absorbování zeleného světla. Pouze jeden typ sondy obsahuje kulička a v daném čipu leží na specifické pozici. Pozitivní reakce znamená přítomnost fluorescence v dané pozici, a tudíž i přítomnost vyšetřovaného polymorfismu.

Detekce je založená na snímání fluorescenčních signálů pomocí fluorescenčního mikroskopu. Následuje vyhodnocení signálů v příslušném programu.

Platformu Human Erythrocyte Antigen-HEA BeadChip firmy BioArray Solutions (USA) poskytuje společnost Immucor, která se v roce 2008 přijala BioArray Solutions jako součástí firmy. PreciseType™ HEA Molecular BeadChip detekuje 24 erytrocytárních polymorfismů asociovaných s 38 antigeny a fenotypovými variantami v jednom testu. [39]



Obrázek 14 Ukázka BeadChipu [34]

### BioArray™ HEA BeadChip™ (BioArray Solution)

Je to in-vitro diagnostický test, který se využívá pro molekulární stanovení alelických variant krevních skupin. Souprava HEA BeadChipu obsahuje 24 polymorfismů s 38 erytrocytárními antigeny a varianty fenotypů viz. Tabulka. [40]

Tabulka 1: Znaky pro Erytrocytární antigeny v metodě BeadChip [40]

Krevně skupinový systém	Analyt	Nukleotidový polymorfismus	ISBT Fenotyp	ISBT Genotyp
Rh	c/C	307 C>T	RH4, RH2	RHCE*4, RHCE*2
		109 Ins		
	e/E	676 G>C	RH5, RH3	RHCE*5 RHCE*3
	Vs V	733 C>G 1006 G>T	RH20 RH10	RHCE*01.20.01, RHCE*01.20.02, RHCE*01.20.04, RHCE*01.20.05
Kell	K/k	698 T>C	KEL1, KEL2	KEL*01, KEL*02
	Js <sup>a</sup> /Js <sup>b</sup>	1910 C>T	KEL6, KEL7	KEL*06, KEL*07
	Kp <sup>a</sup> /Kp <sup>b</sup>	961 T>C	KEL3, KEL4	KEL*03, KEL*04
Duffy	Fy <sup>a</sup> /Fy <sup>b</sup>	125 G>A	FY1, FY 2	FY*01, FY*02
	GATA (Silencing FY)	-67 T>C*	FY -2	FY*02N.01
	Fyx[Fy(b <sup>+</sup> w)]	265 C>T	FY2W	FY*02M
Kidd	Jk <sup>a</sup> /Jk <sup>b</sup>	838 G>A	JK1, JK2	JK*01, JK*02
MNS	M/N	59 C>T	MNS1, MNS2	GYPA*01, GYPA*02

	S/s	143 T>C	MNS3, MNS4	GYPB*03 GYPB*04
	Silencing S	Ex5 230C>T	MNS-3, 5W	GYPB*03N.01 GYPB*03N.02      nebo
	Silencing S	In5 g>t		GYPB*03N.03 GYPB*03N.04      nebo
Lutheran	Lu <sup>a</sup> /Lu <sup>b</sup>	230 A>G	LU1, LU2	LU*01, LU*02
Dombrock	Do <sup>a</sup> /Do <sup>b</sup>	793 A>G	DO1, DO2	DO*01, DO*02
Dombrock Landsteiner-Wiener	Hy <sup>+</sup> /Hy <sup>-</sup>	323 G>T	DO4	DO*04
	Jo(a <sup>+</sup> )/Jo(a <sup>-</sup> )	350 C>T	DO5	DO*05
	LW <sup>a</sup> /LW <sup>b</sup>	308 A>G	LW5, LW7	LW*05, LW*07
Diego	Di <sup>b</sup> /Di <sup>a</sup>	2561 C>T	DI2, DI1	DI*02, DI*01
Colton	Co <sup>a</sup> /Co <sup>b</sup>	134 C>T	CO1, CO2	CO*01, CO*02
Scianna	Sc1/Sc2	169 G>A	SC1, SC2	SC*01, SC*02

### Princip metody bioarray s použitím BioArray™ HEA BeadChip™

HEA BeadChip pracuje na principu elongace zprostředkované k identifikaci přítomnosti či nepřítomnosti vybraných alel, které jsou spojené s určitým fenotypem. [40]

Po multiplexové PCR amplifikaci a post PCR analýze se použije Clean-up Reagent a Lambda Exonukleázy, jednovláknové DNA (ssDNA) jsou inkubovány na BioArray Solutions BeadChip array, kde dochází k nasednutí primerů na specifická místa DNA/sondy. Během následujícího kroku-elongace dojde k syntéze a navázání fluorescenčně označených dNTP molekul pouze na sondy, kde na konec 3' se přesně shoduje s připojenou DNA. Produkty elongace alely A a B jsou současně detekovány pomocí vyobrazení celého souboru. Každá sonda je kovalentně připojena k spektrálnímu rozpoznatelnému bead typu. Knihovna jednotlivých bead typů obsahuje všechny známé sondy, včetně vnitřní pozitivní, negativní a systémové kontroly. Knihovna je imobilizována v BeadChip souboru, který poskytuje souběžně detekovat hledané polymorfismy.[40]

### BioArray Solutions Array imaging System (AIS400)

- Používá se pro zachycení fluorescenčního signálu z jednotlivých čipů.
- Vytváří obrázek z celého souboru a identifikuje čip dle jeho barvy.
- Také reportuje průměrnou intenzitu signálu, vygeneruje koeficient síly signálů a vypočítá počet čipů změřených pro každý typ sondy. [40]

### HEA analytický software BioArray Solutions Information System (BASIS™)

Tento systém se využívá k importu intenzity výstupů, vyhodnocuje platnost vnitřních kontrol a generuje výsledky metody.[40]

Pracovní postup zahrnuje:

- 1/ DNA extrakci
- 2/ Multiplex PCR
- 3/ Post-PCR processing
- 4/ BeadChip analýzu a interpretaci

DNA extrakce se může provádět z plné krve. Laboratoře mohou mít zavedený systém pro izolaci DNA. Multiplex PCR využívá několikanásobné cílové sekvence, která amplifikuje ve stejném čase. Po provedení multiplex PCR se provádí Clean-up k odstranění zbytkových primerů. [38]



Obrázek 15]Jednotlivé fáze testování [40]

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je stanovení alelických variant fenotypových antigenů na lidských erytrocytech krevně skupinových znaků u dárců krve pomocí kitu BioArray™ HEA BeadChip™ (BioArray Solution).

V obecné části práce budou probrány jednotlivé krevně skupinové systémy dle nomenklatury ISBT, principy vyšetření těchto systémů v komparaci se serologickými metodami manuálními či automatizovanými.

Praktická část se bude věnovat molekulárním stanovením alelických variant fenotypových antigenů na lidských erytrocytech krevněskupinových systémů Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton, Scianna pomocí lidské genomové DNA se speciálním zaměřením na aplikaci v transfuzním lékařství.

## 5 METODIKA

### Izolace DNA

**Zařízení:** QIAcube (QIAGEN, USA) a aktivní flowbox Eppendorf

**Reagencie:** QIAamp DNA Blood Mini Kit, proteáza, 96% ethanol

**Spotřební materiál:** Columns tube, Eppendorf tubes, QIAcube tips 1000 a 200 µl

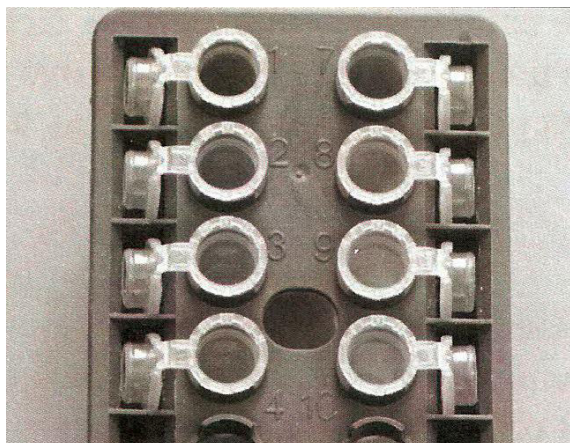
**Vzorek:** 200 µl plné krve dárce, zkumavka Greiner Bio-One, typ Vacuette, antikoagulant K<sub>2</sub>EDTA.

*Je možné vyšetřit ihned po základních imunohematologických vyšetřeních, ev. je možné zamrazit při -20°C a k izolaci použít zamraženou krev.*

**Eluční objem:** clean DNA: 100 µl

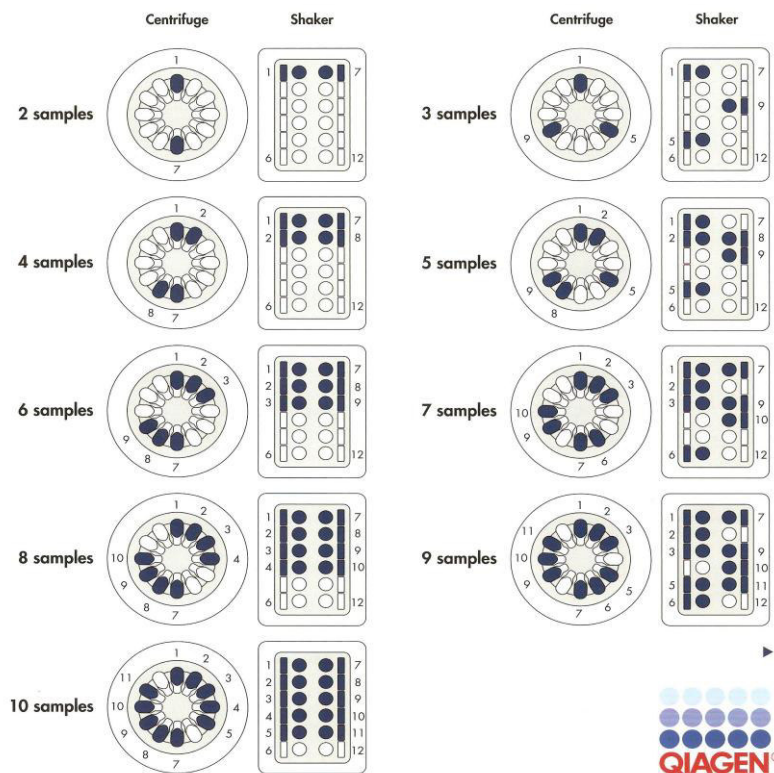
### Pracovní postup:

- Do základních eppendorf tubes (objem 1,5 ml) napipetujeme 200µl plné krve dárce, na zkumavky i na pracovní list nalepíme shodný ID barcode vytištěný z LIS (TIS Brno).
- Zkumavky umístíme do pozice pro vzorky dle návodu v datasheet viz. Obr. 34.



Obrázek 16 Umístění vzorků [40]

- Proteázu umístíme do příslušné pozice v QIAcube, objem proteázy se řídí množstvím izolovaných vzorků.
- Do rotoru centrifugy umístíme jednotlivé izolační minirotorové adaptéry s filtračními mikrozkuvkami, na tyto mikrozkuvky nalepíme ID barcode dárce, který odpovídá ID barcodu na zkumavce vzorku a pracovním listu.
- Rotorové adaptéry je nutné naložovat podle očíslovaných pozic vzorků a pracovního listu izolace, viz obrázek a spustit příslušný program.



Obrázek 17 Pozice rotoru dle pozic vzorku [40]

- Po izolaci opatrně vyjmeme mikrozkuhavku s čistou DNA, zbytek rotor adaptéru s lyzátem vyhodíme do infekčního odpadu. Zásobník s použitými špičkami po ukončení protokolu vysypeme a přístroj vyčistíme před a po použití ethanolem. [41]

## **Genotypizace**

### **Zařízení:**

- Mikroskop Array Imaging systém (BioArray Solution)
- Hybridization Boekel oven (Boekel scientific, PA, USA)
- Centrifuga Eppendorf 584
- Eppendorf Mix Mate Thermomixer,
- Applied Biosystems Veriti™ Thermal cycler (Veriti Scientific, USA)

**Vzorek:** izolát lidské genomové DNA

**Reagencie:** BioArray™ HEA BeadChip™ (BioArray Solution)

### **Zásady při práci**

- S každou sérií vzorku testujeme negativní kontrolu (součástí kitu). Je-li testováno více čipů za den, neg QC může být použita pouze pro první run.
- Všechny pipety musí být kalibrované.
- Pečlivě promícháme vzorky a reagenty.
- Připravíme si požadované množství reagentů, vzorků a kontrol a jsou-li zmražené, necháme je před použitím rozmrazit.
- Vyjmeme z balení BeadChip sklíčko a před použitím jej necháme vytemperovat na pokojovou teplotu.
- Přesné pipetování vzorků a reagentů je důležité pro správnost výsledků.



## Pracovní postup

### Příprava Master Mixu

Ve flowboxu si připravíme přesný objem MasterMixu dle tabulky níže.[44]

Tabulka 2 Příprava Master Mix-množství použitých reagentů [44]

Počet vzorků	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
HEA eMAP PCR mix (μl)	16	144	296	448	592	736	880	1008	1168	1296	1456	1584	1744
Hotstar Taq DNA Polymerasa (μl)	1,0	9,0	18,5	28,0	37,0	46,0	55,0	63,0	73,0	81,0	91,0	99,0	109,0

- Napipetujeme 17,0 μl PCR Master Mix do označeného PCR stripu
- PCR strip zavíčkujeme a přeneseme mimo flowbox
- Do každé PCR mikrozkuhavky napipetujeme 8,0 μl vyizolované DNA a 3x pomocí pipety promícháme
- Negativní kontrolu, napipetujeme beznukleázy Injection aqua Braun nebo použijeme negativní kontrolu z kitu Bioarray do příslušné jamky. Jako pozitivní kontrolu využijeme již zamražených připravených kontrol (několikanásobně otypovaní dárce)
- Strip vložíme do MixMate a zvortexujeme na 30s/2500mix
- Strip ukotvíme do thermocycleru a zvolíme program HEA PCR:
  - 94°C 15 min
  - 94°C 30 sec, 60 % ramp
  - 60°C 30 sec, 50 % ramp 30 cyklů
  - 68°C 50 sec, 35 % ramp
  - 68°C 8 min
  - 4°C do vyjmutí, ne déle než 24 hodin
- Doba cyklování je 1 hod 48 min.

### **Post-PCR: ošetření amplikonu**

PCR produkt důkladně promícháme na MlXMate a centrifugujeme, aby se vzorek dostal na dno mikrozkušavky. Označíme nový PCR strip čísly shodně jako předchozí. Do tohoto nového stripu přeneseme multikanálovou pipetou 6,5 µl PCR produktu z předchozího stripu a přidáme 2 µl Clean-up reagentu a 3x pipetou promícháme. Strip zavíčkujeme a umístíme do thermocykleru, zvolíme aplikaci HEA Clean-up.[44]

- 37°C 25 min.
- 80°C 15 min.
- 4°C do vyjmutí, ale ne déle než 24 hodin
- Doba cyklování je 48 min.

### **Post-PCR: Jednovláknová cílová generace**

PCR produkt důkladně promícháme na MlXMate a centrifugujeme, aby se vzorek dostal na dno mikrozkušavky. Do mikrozkušavek napipetujeme 2 µl Lambda Exonukleázy a rozvortexujeme. Strip zavíčkujeme a umístíme do thermocykleru, zvolíme aplikaci HEA Lambda.[44]

- 37°C 25 min.
- 80°C 15 min.
- 4°C do vyjmutí, ale ne déle než 24 hodin
- Doba cyklování je 48 min.

Poté zapneme hybridizační troubu (automaticky nastavena na 53 °C ± 2°C), do nosiče čipů umístíme navlhčenou buničinu tak, aby došlo po vložení čipů k podpaření spodní vrstvy sklíčka.[44]

## **Post-PCR Elongace a odečítání výsledků**

BeadChip uložíme alespoň na 10 min/RT. Rozvortexujeme PCR produkt. Napipetujeme 10  $\mu$ l MAP® Elongation Mix Reagent a 3x pipetou promícháme. Beadchip označíme jednotlivými čísly izolátů. Napipetujeme 15  $\mu$ l elongační reakční směsi na BeadChip. Umístíme BeadChip na nosič(e) do hybridizační pece a inkubujeme 30 min. při 53°C. Vyjmeme BeadChip nosič z hybridizační pece a odmyjeme elongační směs z povrchu BeadChipu nosiče, Beadchip vysušíme vzduchem ve spreji. Přečteme BeadChip sklíčka pomocí BioArray Solutions AIS 400 Array Imaging System. Za použití HEA software v BioArray Solutions Information System (BASIS) analyzujeme snímky jednotlivých čipů.[44]

## **Postup v SW počítače**

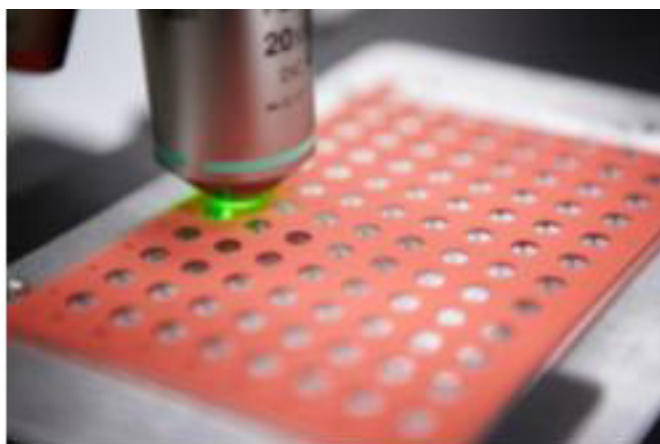
### **Software AISR**

Po zapnutí zdroje mikroskopu a lampy dojde k náběhu světelného zdroje cca 15 s. Poté na magnetický posuvný stolek zafixujeme ETC chip, který slouží ke kalibraci světelného zdroje mikroskopu. Joystickem je možné upravovat polohu chipu pod mikroskopem, tak aby byl přímo ve středu světelného zdroje. Laserovou čtečkou načteme barcode chipu a klikneme na go. Dojde k sejmutí chipu a načte se výsledkový protokol. Pokud je výsledek testu: PASSED, je možné pokračovat v měření Beadchipu. Osušený Beadchip zafixujeme na pohyblivém stolku mikroskopu. Laserovou čtečkou načteme ID barcode mikroskopu a zvolíme go. Dojde k postupnému snímání všech 8 čipů. Po sejmutí všech čipů dáme exit.[44]

- Držíme sklíčko(a) nebo desku ve vertikální poloze a dotýká se misky.
- Každý BeadChip jednotlivě opláchneme ve stejném tlaku proudem destilované nebo deionizované vody. Proud vody by měl být směřován a promýván svisle ku sklíčku asi 2-3 cm od středu každého BeadChipu. Každý BeadChip promýváme po dobu asi 3 sekund.
- Vysušíme vodu ze sklíčka pomocí stlačeného spreje vzduchu. Netřepeme se vzduchovým sprejem. Odstraníme zbývající vodu ze zadní strany sklíčka pomocí jednorázového čistícího ubrousku.
- Necháme přechyst BeadChip sklíčka pomocí BioArray Solutions AIS 400 Array Imaging Systém. Analyzujeme obrázky za použití HEA software v BioArray Solutions Information Systém (BASIS). [41]

### **Analýza výsledků**

BioArray Solutions Information system (BASIS) spočítá data intenzity signálu BeadChipu™ metody z každého oligonukleotidu, který je detekován specifickou alelou k určení přítomnosti či nepřítomnosti každé alely. Všechny výpočty jsou vyhodnoceny pomocí HEA Analysis Software v BioArray Solutions Information Systém (BASIS). [41]



*Obrázek 18 Sejmutí čipu mikroskopem [45]*

Následující zprávy se mohou objevit u výsledků jednotlivých alel viz. Tabulka 3.

*Tabulka 3: Výsledky jednotlivých alel [41]*

Varování		
LS	Low Signal  (Slabý signál)	Indikuje, že intenzita signálu pro specifickou alelu je příliš nízká a vzorek je invalidní. Analýza pro tuto alelu nemůže být uzavřena. Objeví-li se tato zpráva pro jakoukoliv alelu vyjma S/s (ukazuje na U(-), viz poznámky níže) jsou vzorky neplatné: Opakujte analýzu a dávejte pozor během manipulace s reagenty a pipetování. Objeví-li se varovná zpráva opakovaně, kontaktujte technickou podporu nebo distributora.
HB	High Background  (Vysoké pozadí)	Indikuje, že pozadí pro jednotlivý BeadChip je příliš vysoké a výsledek je neplatný. Pro daný vzorek není vytvořen žádný výsledkový záznam. Opakujte analýzu a dávejte pozor během manipulace s reagenty a pipetování. Objeví-li se varovná zpráva opakovaně, kontaktujte technickou podporu nebo distributora.
IC	Indeterminate Call  (Neurčitá chyba)	Znamená, že výsledek narušila nějaká chyba daná pro konkrétní antigen. Ten je příliš blízko mezní hodnotě, proto se nedosáhne tak vysoké spolehlivosti výsledku. Výsledky všech antigenů bez tohoto kódu mohou být reportovány, pokud se neobjeví 4 nebo více IC varování pro stejný vzorek, v takovýchto případech je vzorek invalidní a neměl by být žádný výsledek fenotypu hlášen. Objeví-li se IC upozornění, je třeba pro určení správného výsledku antigenů zopakovat test od kroku Post-PCR Processing – Amplicon Treatment (postup testu krok XIII) za použití PCR produktu skladovaného při -20°C. Objevuje-li se upozornění opakovaně, zopakujte tento test od kroku PCR amplifikace (krok XII) a použijte již připravený vzorek DNA skladovaný při -20°C. Přetrvává-li upozornění, kontaktujte technickou podporu nebo distributora.
CV	Coefficient of Variation	

## **Soubor dárců**

V praktické části bylo metodou Beadchip bioArray vyšetřeno 15 dárců krevní skupiny 0 RhD- a 3 dárci krevní skupiny 0 RhD+ (přednostní typování dárců s univerzální krevní skupinou 0RhD-pro urgentní podání transfúzních přípravků v případě vitální a statimové indikace). Tito dárci jsou opakovanými dárci plné krve, plasmy nebo trombocytů v UVN-VFN Praha nebo v odběrových střediscích náležících k UVN (Louny, Jilemnice, Mělník) a splňují kritéria jako dárci krve dle vyhlášky č. 304/2015 Sb. Po vyšetření byly výsledky testování odeslány automaticky softwarem BASIS AIS do laboratorního informačního systému (TIS Brno). Výsledky poté byly tisknuty na štítek krevní konzervy, která byla posléze předána do expedičního skladu.

## 6 VÝSLEDKY

V období od 10.2.2017 do 7.5.2017 bylo testováno 15 dárců krevní skupiny 0 RhD- a 3 dárce krevní skupiny 0 RhD+ (přednostní typování dárců s univerzální krevní skupinou 0RhD-pro urgentní podání transfúzních přípravků v případě vitální a statimové indikace). V tomto období nebylo možné testovat větší množství dárců krevní skupiny 0-, neboť nebylo požádáno o náběr těchto dárců telefonicky lékařem. Telefonické či emailové žádosti jsou nutné v případě kritického snížení zásob expedičního skladu transfúzních přípravků, což v tomto období nenastalo. Krevní skupiny, BRhD+/-, ABRhD+/-, ARhD+/- nejsou metodu bioarray prozatím testovány, neboť nejprve musí dojít k protypování dárcovské základny krevní skupiny 0 RD-, resp. 0 RhD+.

Systém práce byl nastaven jako v rutinním procesu, čipování bylo možné zpětně u každého dárce dohledat na základě systému ID barcodů. Základní je ID barcode primární zkumavky, který je načten do LIS, (vytvoření tzv. pracovních listů) ze kterého se tisknou další 2 shodné kódy pro:

- Primární zkumavku na izolaci DNA (pipetování plné krve dárce)
- Zkumavku v miniadaptéru použitého při izolaci DNA (zkumavka s clean DNA sloužící k zamražení nebo k okamžitému použití pro genotypizaci)

Těchto 18 dárců byl dále testováno laborantkami UVN serologickými metodami:

- manuálními (AGH a zkumavkové metody) na principu aglutinace
- na automatickém imunohematologickém analyzátoru Galileo (Immucor)

## **Manuální metody**

Testovány parametry: Lu<sup>ab</sup>, Le<sup>ab</sup>

Analyzátor Galileo

Testovány parametry: DCcEeKC<sup>w</sup> (základní fenotypové vyšetření dárce)

+ speciální assay: Kp<sup>ab</sup>, Ss, M, N, P, Jk<sup>ab</sup>, Fy<sup>ab</sup>. Antigeny Lu<sup>ab</sup> a Le<sup>ab</sup> nejsou automatizovanou metodou k dispozici.

## **Tabulkové zhodnocení výsledků**

Do bakalářské práce přikládáme výsledky všech testovaných dárců. Výsledky erytrocytárních antigenů je možné generovat:

1/ v tabulce fenotypové viz obr 22, 23, 26 a 27.

2/ v tabulce genotypové viz obr 20, 21, 24 a 25.

Na základě konzultace s IT specialisty firmy TIS, která spravuje laboratorní informační systém na OHKT UVN, lékařů klinických center a hematologické ambulance ÚVN bylo zvoleno generování výsledků dárců ve formě fenotypu, které je pro lékaře, který indikuje podání transfuzního přípravku včetně zdravotní sestry u lůžka lépe srozumitelné.

Tabulky fenotypu i genotypu popisují v základním řádku krevně skupinový systém vlastním jménem bez klasifikace ISBT včetně jednotlivých antigenů např.: M, N, s, S, Jk<sup>ab</sup>, Fy<sup>ab</sup>.

U HEA beadchipu není vyšetřován systém Lewis: není přítomen na erytrocytární membráně, systém P a C<sup>w</sup>. U HEA beadchipu je možné vyšetřit HbS



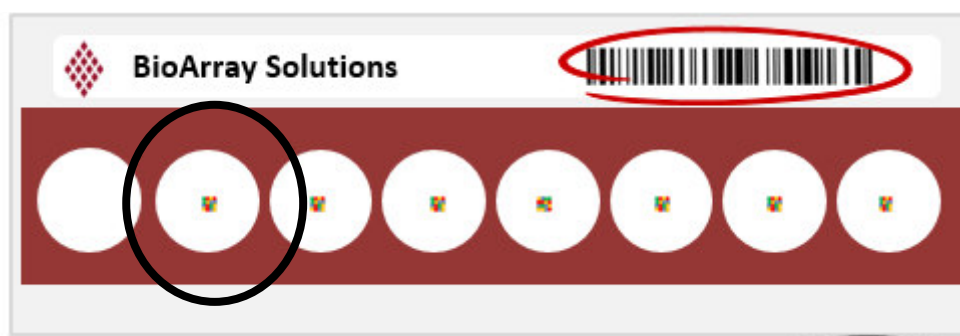
### Forma výsledků:

A/ 0: antigen není v krevně skupinovém znaku přítomen: např.: Jk<sup>a</sup>0

B/ +: antigen je v krevně skupinovém znaku přítomen: Jk<sup>a</sup>+

Chip: HEAD4292 – značí lot daného čipu. HEAD4292\_1, HEAD4292\_2 atd. značí pozici na čipu.

Např.: HEAD4292\_2 sample 17110099: dárce číslo 17110099 je umístěn v druhé pozici čipu viz obr 19



Obrázek 19Obrázek čipu [34]

QC – jedná se o negativní kontrolu. Tato kontrola musí vykazovat tzv. low signal a nesmí mít pozitivní žádný antigen, pokud v neg QC vyšla pozitivita, jde o kontaminaci a celý run typování je třeba zopakovat. Výsledky nejsou validní.

Ze souborů dárců vyloučen po testování dárce č. 17130034 – po vyhodnocení softwarem zjištěny slabé signály (LS) a intermediate call (IC) již v základních antigenech CcEeKk. Do laboratorního informačního systému nebyly výsledky přeneseny. Dárce bude znovu pozván a vyšetřen. V laboratoři zaznamenáno jako neshoda.

#### **Komentář k neshodě:**

LS: Indikuje, že intenzita signálu pro specifickou alelu je příliš nízká a vzorek je invalidní. Analýza pro tuto alelu nemůže být uzavřena. Objeví-li se tato zpráva pro jakoukoliv alelu vyjma S/s (ukazuje na U (-)), vzorek je nutné napipetovat. V našem případě dojde k nové izolaci z nového náběru.

IC: Výsledek narušila chyba daná pro konkrétní antigen. Ten je příliš blízko mezní hodnotě, proto se nedosáhne tak vysoké spolehlivosti výsledku. Výsledky všech antigenů bez tohoto kódu mohou být reportovány, pokud se neobjeví 4 nebo více IC varování pro stejný vzorek, v takovýchto případech vzorek je invalidní a neměl by být žádný výsledek fenotypu hlášen. Objeví-li se IC upozornění, je třeba pro určení správného výsledku antigenů, zopakovat test od kroku Post-PCR Processing – Amplicon Treatment. V našem případě dojde k nové izolaci z nového náběru.

## 7 GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ VÝSLEDKŮ

Stránka: 1 z 1 Vytisknuto dne:

### Pracovní list: Genotypizace

#	Lab. č.	Odběr	KS	Rodné číslo	Příjmení	Jméno
1.	&/16113666	23.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Lu(a+b+)						
2.	&/16113692	26.09.2016	A+			
Ccee Cw- kk Fy(a+b+) Jk(a+b-) Lu(a+b+) Le(a+b-) Js(a+b+) Co(a+b-) M+N+Ss Kp(a+b+) LW(a+b-) Di(a+b-) Jaa+ Hy+ Sc1+ Sc2- Do(a+b+)						
3.	&/16113662	23.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Lu(a+b+)						
4.	&/16113674	23.09.2016	O+			
Ccee Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a+b+) Lu(a+b+)						
5.	&/16422662	26.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Lu(a+b+) Le(a+b+)						
6.	&/16130928	13.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- Kk Fy(a+b+) Jk(a+b-) Lu(a+b+) Le(a+b+) M+N+ Kpa-						
7.	&/16130920	13.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a+b+) Lu(a+b+) Le(a+b+) M+N+ Kpa-						

Vytiskl: Dana Horčíčková

Obrázek 20 Genotypizace I

Stránka: 1 z 1 Vytisknuto dne:

### Pracovní list: Genotypizace

#	Lab. č.	Odběr	KS	Rodné číslo	Příjmení	Jméno
1.	&/17140049	12.01.2017	O+			
Ccee Cw- K- Lu(a+b+) Le(a+b+)						
2.	&/17110099	12.01.2017	O+			
CcEe Cw- K-						
3.	&/17130034	17.01.2017	O+			
Ccee Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a+b+) Lu(a+b+) Le(a+b+) M+N+Ss P1+ Kp(a+b+)						
4.	&/17110176	18.01.2017	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a+b-) Lu(a+b+) Le(a+b+) M+N+Ss P1+ Kp(a+b+)						
5.	&/17110221	19.01.2017	O+			
CcEe Cw- Kk Fy(a+b+) Jk(a+b-) Lu(a+b+) Le(a+b-) M+N-Ss P1+						
6.	&/17110217	19.01.2017	O+			
Ccee Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a+b+) Lu(a+b+) Le(a+b+) M+N+Ss P1+ Kp(a+b+)						

Vytiskl: Gabriela Krivánková

*G. Krivánková*  
*J. - GE*

Obrázek 21 Genotypizace II



## wHEA Phenotype Result Table

Print Date: April 10, 2017

			Rh				Kell				Kidd		Duffy		MNS				Lutheran		Diego		Colton		Dombrock				LW		Scianna		Hemoglobin S				Detail	Notes		
Chip	Sample	Status	c	C	e	E	K	k	Kpa	Kpb	Jsa	Jsb	Jka	Jkb	Fya	Fyb	M	N	S	s	Lua	Lub	Dia	Dib	Coa	Cob	Doa	Dob	Joa	Hy	LWa	LWb	Sc1	Sc2	HbS					
HEAD4292_1	17140049		0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAD4292_2	17110099		+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0				
HEAD4292_3	17130034	LS(6), IC(12)	+	IC	IC	IC	0	+	0	+	IC	+	IC	+	LS	LS	+	+	IC	IC	LS	LS	LS	LS	+	0	+	+	+	+	IC	IC	IC	IC	IC					
HEAD4292_4	17110176		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0				
HEAD4292_5	17110221		+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0				
HEAD4292_6	17110217		+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0				
HEAD4292_7	Svoboda		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0				
HEAD4292_8	QC neg	LS(33)	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS				

Obrázek 22Výsledek fenotypu



## wHEA Phenotype Result Table

Print Date: April 10, 2017

			Rh				Kell						Kidd		Duffy		MNS					Lutheran		Diego		Colton		Dombrock				LW		Scianna		Hemoglobin s			Detail	Notes
Chip	Sample	Status	c	C	e	E	K	k	Kpa	Kpb	Jsa	Jsb	Jka	Jkb	Fya	Fyb	M	N	S	s	Lua	Lub	Dia	Dib	Coa	Cob	Doa	Dob	Joa	Hy	LWa	LWb	Sc1	Sc2	HbS					
HEAC8947_1	16113666		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAC8947_2	16113692		+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAC8947_3	16113662		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAC8947_4	16113674	IC(1)	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	IC	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAC8947_5	16422662		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAC8947_6	16130928		+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAC8947_7	16130920		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAC8947_8	-QC	LS(33)	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS				

Obrázek 23 Výsledek fenotypu II

Stránka: 1 z 1 Vytlačeno dne:

### Pracovní list: Genotypizace

#	Lab. č.	Odběr	KS	Rodné číslo	Příjmení	Jméno
1.	&/16121523	21.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K-						
2.	&/16113615	20.09.2016	O+			
Ccee Cw- kk Fy(a-b+) Jk(a+b-) Lu(a-b+) Le(a-b-) M+N+Ss P1+ Kp(a-b+)						
3.	&/16121479	14.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- Kk Lu(a-b+) Le(a-b+)						
4.	&/16121501	19.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- kk Fy(a-b+) Jk(a+b+) Lu(a-b+) Le(a-b+) M+N+Ss P1+ Kp(a-b+)						
5.	&/16130963	20.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Fy(a+b-) Jk(a+b+) Lu(a-b+) Le(a-b-) M+N+Ss P1+ Kp(a-b+)						
6.	&/16113556	14.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Lu(a-b+) Le(a-b-)						
7.	&/16113612	20.09.2016	O+			
CcEe Cw- kk Fy(a-b+) Jk(a-b+) Lu(a-b+) Le(a-b+) M+N+Ss P1+ Kp(a-b+) Yta-						

Vytiskl: Dana Horčíčková

Obrázek 24 Genotypizace III

Stránka: 1 z 1 Vytlačeno dne:

### Pracovní list: Genotypizace

#	Lab. č.	Odběr	KS	Rodné číslo	Příjmení	Jméno
1.	&/16113666	23.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Lu(a+b+)						
2.	&/16113692	26.09.2016	A+			
Ccee Cw- kk Fy(a-b+) Jk(a+b-) Lu(a-b+) Le(a-b-) Js(a-b+) Co(a+b-) M+N+Ss Kp(a-b+) LW(a+b-) Di(a-b+) Jsa+ Hy+ Sc1+ Sc2- Do(a+b+)						
3.	&/16113662	23.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Lu(a-b+)						
4.	&/16113674	23.09.2016	O+			
CcEe Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a+b+) Lu(a-b+)						
5.	&/16422662	26.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Lu(a-b+) Le(a-b+)						
6.	&/16130928	13.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- Kk Fy(a-b+) Jk(a-b+) Lu(a-b+) Le(a-b+) M+N+ Kpa-						
7.	&/16130920	13.09.2016	O-			
Dw/v- ccee Cw- K- Fy(a-b+) Jk(a+b+) Lu(a-b+) Le(a-b+) M+N+ Kpa-						

Vytiskl: Dana Horčíčková

Obrázek 25 Genotypizace IV

[illegible]

63



## wHEA Phenotype Result Table

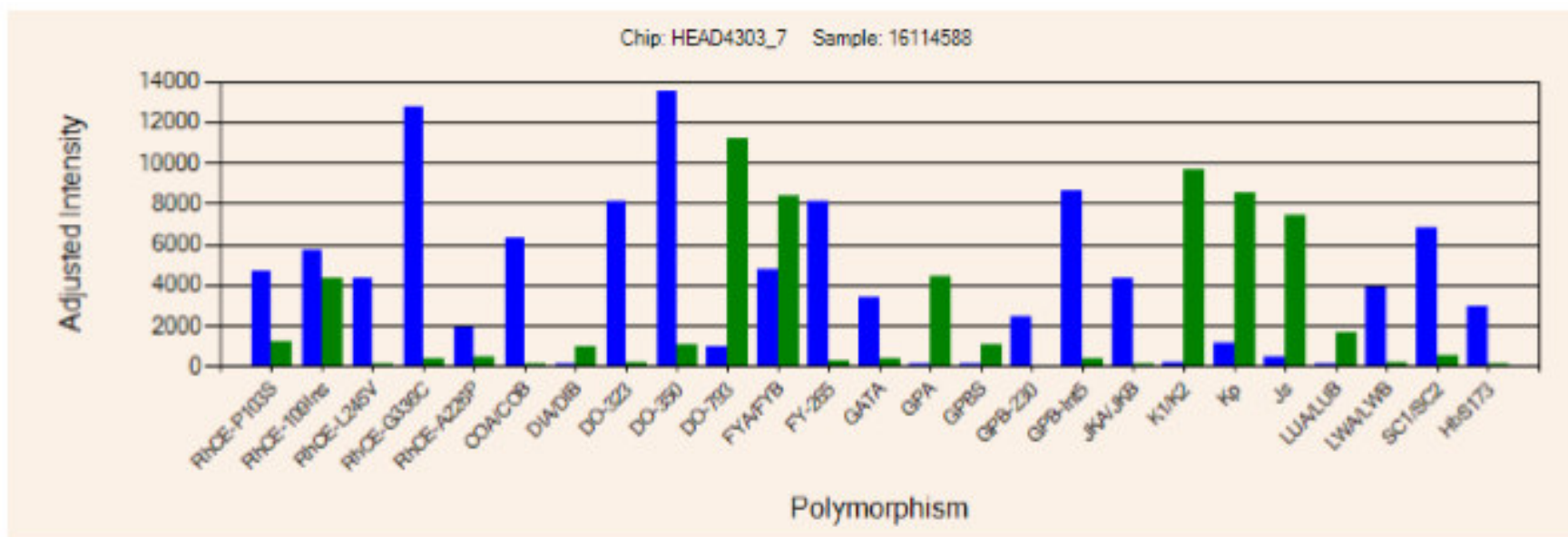
Print Date: April 10, 2017

			Rh				Kell								Kidd		Duffy		MNS				Lutheran		Diego		Colton		Dombrock				LW		Scianna		Hemoglobin s			Detail		Notes	
Chip	Sample	Status	c	C	e	E	K	k	Kpa	Kpb	Jsa	Jsb	Jka	Jkb	Fya	Fyb	M	N	S	s	Lua	Lub	Dia	Dib	Coa	Cob	Doa	Dob	Joa	Hy	LWa	LWb	Sc1	Sc2	HbS								
HEAD4303_1	-QC	LS(33)	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS						
HEAD4303_2	17120108		0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0							
HEAD4303_3	17430091		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0								
HEAD4303_4	16121882		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0								
HEAD4303_5	17130066		+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0								
HEAD4303_6	16114582		0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0							
HEAD4303_7	16114588		+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0							
HEAD4303_8	17140081		+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0							

Obrázek 27 Výsledek fenotypu IV

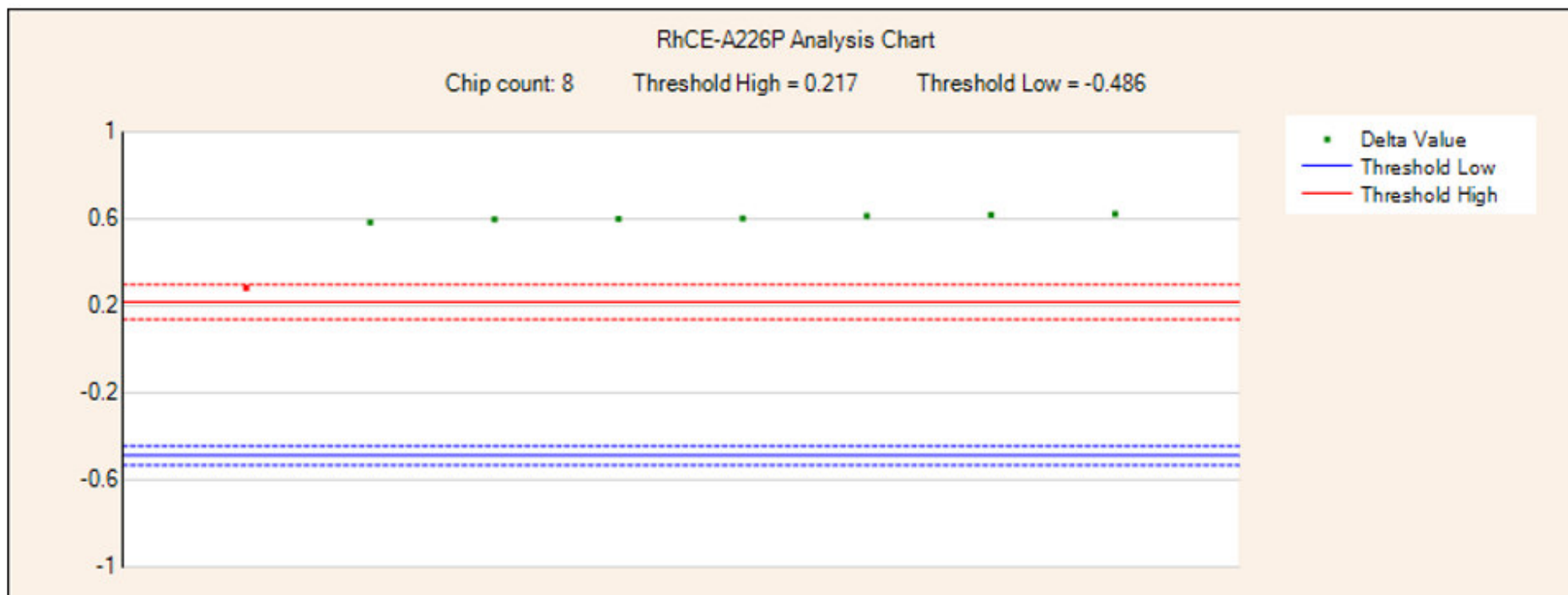


- V rutinním vyšetřování se nepoužívá. Pro každého dárce je možné v softwaru vygenerovat grafickou jednotlivých polymorfismů. Do práce přikládáme pouze ukázkou z jednoho čipování. Viz obr 28.

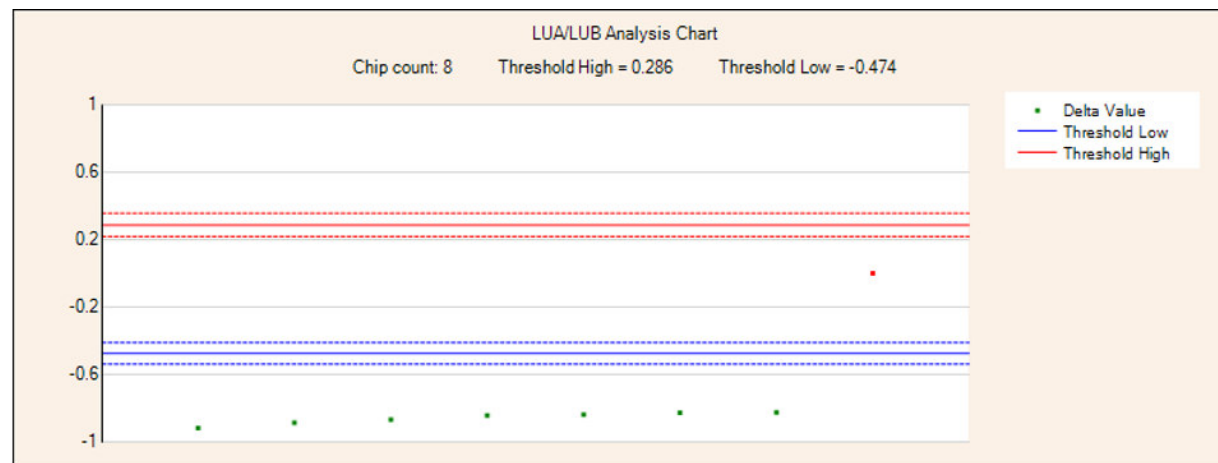


Obrázek 28 Graf polymorfismu vzorku 16114588

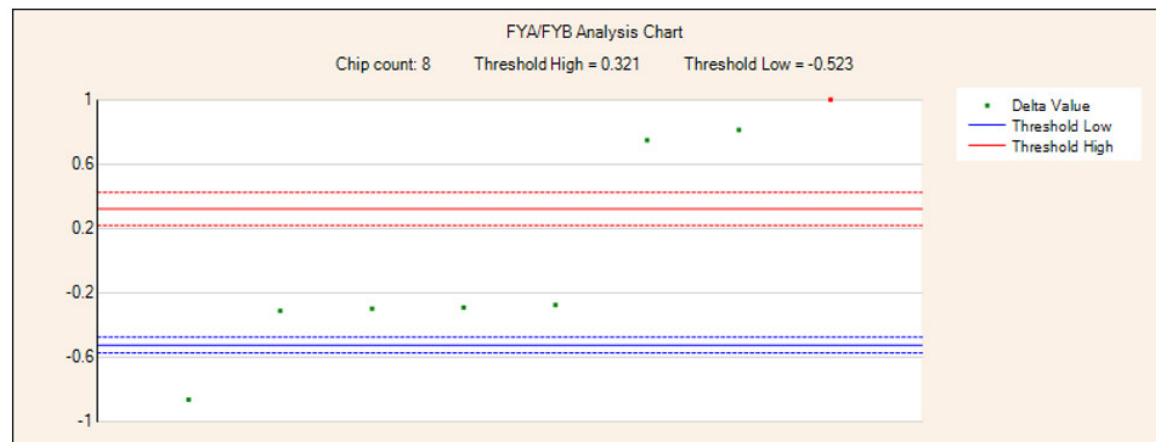
- Dále přikládáme tzv. bodové threshold grafy, které rovněž nejsou v rutinním testování používány, ale je možné je ze systému generovat. Názorně ukazují sílu signálu pro jednotlivé antigeny. Viz obr 29, 30 a 31.



Obrázek 29 Graf intenzity I



Obrázek 30 Graf intenzity II



Obrázek 31 Graf intenzity III

## 8 DISKUZE

V období od 10.2.2017 do 7.5.2017 bylo testováno 15 dárců krevní skupiny 0 RhD- a 3 dárci krevní skupiny 0 RhD+ metodou BeadChip BioArray-kitem BioArray™ HEA BeadChip™ (BioArray Solution), zároveň byli tito dárci testováni serologickými metodami (manuálními i automatizovanými) se stejným výsledkem.

Na povrchu membrány erytrocytů se nachází krevně skupinové antigeny, které jsou polymorfní. Dědičné proteiny nebo karbohydrátové struktury, jsou navázány na proteiny nebo lipidy. U některých jedinců se může vyvolat imunitní odpověď organismu proti antigenům, které nejsou exprimovány na erytrocytech. Tyto odpovědi se liší v závažnosti reakcí na akutní, těžké až vůbec žádné. K celoživotní imunizaci dojde, jakmile jsou vytvořeny aloprotilátky i přesto, že je nelze detekovat. Některé lékařské terapeutické postupy vyžadují pravidelné a časté podávání krevní transfuze. Mezi tyto onemocnění patří např. anémie hemolytická, srpkovitá a aplastická. V těchto případech se raději zvolí určení pomocí DNA než serologická fenotypizace, a stává se čím dál tím více užitečnější.

V identifikaci lidských erytrocytárních antigenů nám může pomoci prenatální a postnatální vyšetření hemolytického onemocnění plodu a novorozence (HON). Asi u 0,8 % těhotných žen se vyskytuje krevně skupinová inkompatibilita, která může být také způsobena systémy Kidd, Kell nebo Duffy. Těžkou hemolýzu nebo potlačení erytropoézy může způsobit protilátka anti-Kell.

Na základě vyhlášky č. 304/2015 Sb. jsou povinně vyšetřovány AB0 RhD, fenotyp a screening antierytrocytárních protilátek, fenotyp CcEeCwKk. Oproti tomu protilátky krevních systémů Diego, Scianna, Drombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, Kidd, Duffy, Lewis atd., jsou stanovovány ve specializovaných pracovištích transfuzních oddělení a národní referenční

laboratoři. Detekce těchto systémů umožní zlepšení podávání transfuzních přípravků na základě kompatibility mezi dárce a příjemcem, také to ušetří čas laborantce při možném výskytu protilátek u příjemce, neboť tyto vyšetřené antigeny jsou již součástí štítku krevní konzervy.

Některé antigeny jsou specifické a zaleží na původu jedince. U původních obyvatel amerického kontinentu se vyskytují převážně antigeny Diego systému. U obyvatel Ameriky, černochů či Židů byl detekován antigen Radin. V České republice mají zvýšený výskyt protilátek proti antigenům ze systému Drombrock. Specifitu antigenních protilátek potvrzují Národní referenční laboratoře pro imunohematologii-Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. NRL také disponuje archivem vzácných sér, vzácné krevní transfuzní přípravky jsou k dispozici jako kryokonzervované v Ústřední vojenské nemocnici v Praze.

BioArray technologie jsou nesporným přínosem pro využití ve velkých imunohematologických laboratořích. Např. technika ID CORE je vhodnější vzhledem k použití většího počtu vyšetření v jedné sérii pro testování dárce krve, má menší časovou a finanční náročnost.

Zároveň je vhodná pro testování antigenů polytransfundovaných či autoprotilátkami senzibilizovaných pacientů, u kterých není možné určit přítomnost antigenů sérologickými technikami. Její nevýhodou je, že současně nabízené kity nedetekují antigeny RhD a AB0 systému. Technologie BLOODchip, není vhodná a referenční pro plošné testování dárců krve, protože v jedné sérii testujeme nízký počet vzorků a je časově i finančně náročná. Tato technologie je vhodná pro testování komplikovaných a diskrepantních vzorků s ohledem na detekci vzácnějších genotypových variant, proto je výhodná pro referenční laboratoře, ve kterých se takovéto případy hromadí.

Technologie BeadChip je rovněž výrazným pomocníkem při stanovování doplňujících krevně skupinových znaků. Tento systém je zatím používán v jediné

laboratoři v České republice (OHKT UVN Praha). Jeho nespornou výhodou je krátká doba stanovení (4,5- 5 hod), kdy dostáváme výsledek 8 resp. 96 dárců dle použitého systému (strip – destička) a v jednom okamžiku 38 antigenních variant u jednoho dárce. Díky softwarové technologii BASIC a AIS je možné generovat výsledky nejen ve formě genotypové skladby, ale také ve formě fenotypu, která je více přehlednější a srozumitelnější. Oproti ostatním kitům (ID-CORE atd.) poskytuje informaci o výskytu HbS, který je spojen se srpkovitou anémií. Toto stanovení najde uplatnění především v centrální Africe a Středozeří. Dále tento in-vitro diagnostický test umožní stanovit tyto krevně skupinové systémy: Rh (C, c, E, e, V, VS), Kell (K, k, Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup>, Js<sup>a</sup>, Js<sup>b</sup>), Duffy (Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, GATA, Fy<sup>x</sup>), Kidd (Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>), MNS (M, N, S, s, U, Uvar), Lutheran (Lu<sup>a</sup>, Lu<sup>b</sup>), Dombrock (Do<sup>a</sup>, Do<sup>b</sup>, Hy, Jo<sup>a</sup>), Landsteiner-Wiener (LW<sup>a</sup>, LW<sup>b</sup>), Diego (Di<sup>a</sup>, Di<sup>b</sup>), Colton (Co<sup>a</sup>, Co<sup>b</sup>), Scianna (Sc2, Sc1)

Genetické metody jsou velkým přínosem pro diagnostiku v transfuzní medicíně, nicméně zatím nemohou plně nahradit sérologické testování. Sérologie totiž detekuje přítomnost či nepřítomnost antigenních struktur, zatímco genetické techniky detekují přítomnost určitého genu, který se může, ale nemusí projevit, také se využívají i imunohematologické laboratoři a jsou velmi přínosné při testování krve dárců, kteří mají vzácný fenotyp. Jsou také zařazeni do Registru vzácných dárců (tvz. TransReg) a je zde důležité ověřit sérologické výsledky pomocí genetických metod.

Existuje mnoho dosud nepopsaných mutací, které regulují vznik a výslednou konformaci příslušného antigenu. Tyto mutace v současnosti rutinně dostupné genetické vyšetření nezachytí.

Nemalou roli hraje i cena vyšetření, která je mnohonásobně vyšší než cena vyšetření sérologickou technikou.

Genetické techniky mají také velkou výhodou při stanovování komplikovaných a polytransfundovaných pacientů. Po stanovení genotypu je možné vybírat transfuzní přípravek, který je pro pacienty nejvhodnější a předchází se tak případné přecitlivělosti na odlišné antigeny, které mohou vest k tvorbě protilátek a možné komplikaci při podání krevní konzervy.

## 9 ZÁVĚR

Imunohematologie je vědní obor, který se zabývá studiem a diagnostikou imunitního systému krve, především detekci antigenů a protilátek, stanovením krevních skupin a krevně skupinových systémů a také možností kompatibility transfuzních přípravků s plasmou příjemce (pacienta). Neustále tedy platí, že i přes veškeré snahy o dodržení všech postupů správné laboratorní praxe, všech provedených vyšetření, je podání transfuzního přípravku pro pacienta rizikem. Určení krevně skupinových znaků antigenů erytrocytů nám pomůže toto riziko výrazně snížit díky již známé skladbě antigenů dárce krve, které jsou vyšetřeny molekulárně biologickými nebo jinými typy metod (serologickými manuálními či plně automatizovanými).

Genetické metody jsou velkým přínosem pro diagnostiku v transfuzní medicíně (především pro typování dárce se vzácnou kombinací fenotypu), nicméně zatím nemohou plně nahradit sérologické testování. Sérologie totiž detekuje přítomnost či nepřítomnost antigenních struktur, zatímco genetické techniky detekují přítomnost určitého genu, který se může, ale nemusí projevit. Do určité míry hraje roli v použití těchto metod i finanční stránka, neboť jen velmi specializované laboratoře si mohou dovolit testovat dárce metodami PCR. Pokud je laboratoře používají je nutné tyto genetické metody považovat za přínos z hlediska rychlosti podání transfuzních přípravků do klinických pracovišť na základě již předem vyšetřených antigenů dárce a do budoucna jistě naleznou využití i zařízení transfuzních služeb o menším rozsahu díky svému ohromnému potenciálu.



## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABO	skupinový systém erytrocytů ABO
ADP	adenosin difosfát
AGH	přímý antiglobulinový test
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
AIS	Array Imaging Systém
Anti	protilátka
BASIS	BioArray Solutions Information System
BFU-E	burst forming unit-erytroid
°C	stupně Celsia
cca	přibližně
CD	cédéčko
CFU-E	colony forming unit-erytroid
CMV	Cytomegalovirus
D variant	parciální D-antigen
D weak	slabý D-antigen
Di	antigen erytrocytů Diego

Do	antigen erytrocytů Drombrock
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	kyseliny nukleotid deoxyribonukleové
dsDNA	dvouvláknová kyselina deoxyribonukleová
eMAP	Elongation Mix Reagent
EPO	erythropoetin
Fy	antigen systému Duffy
HbS	Srpkovitá anémie
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HEA	Human Erythrocyte Antigen
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	hlavního histokompatibilního systému
HON	Hemolytické onemocnění novorozence
HPA	Hybridization Protection Assay
HTR	hemolytické transfuzní reakce
ID	identifikační číslo

ICHIS	ischemická choroba srdeční
Ig	imunoglobulin
IL	interleukiny
ISBT	Identifikační číslo typu knihy
Jk	antigen systému Kidd
K <sub>2</sub> EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
l	litr (jednotka objemu)
Le	antigen systému Lewis
Lu	antigen systému Lutheran
Min	minuta (jednotka času)
μl	mikrolitry (jednotka objemu)
μm	mikrometry (jednotka míry)
m-RNA	informační ribonukleová kyselina
např.	například
ng	nanogram (jednotka hmotnosti)
nm	nanometr (jednotka vzdálenosti)
Obr.	obrázek

PCR	polymerázová řetězcová reakce
Pozn.	poznámka
QC	reagenční blank
Rh	skupinový systém erytrocytů Rhesus
S	sekunda (jednotka času)
SCF	stem cell factor
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SW	software
Tj.	to je
TPO	trombopoetin
tzv.	takzvaný
UVN	Ústřední vojenská nemocnice
VFN	Vojenská fakultní nemocnice
viz.	znázorňuje
%	procenta

## 11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. MOUREK, DR SC, prof. MuDr Jindřich. *Fyziologie: Učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. 2., doplněné. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3918-2.
2. LEXOVÁ A KOLEKTIV, Stanislava. *Hematologie: pro zdravotní laboranty*. Brno: Institut pro další vzdělání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 2000. ISBN 80-7013-304-X.
3. PECKA, CSC., RNDr. Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krevetvorba*. Český Těšín: tiskárna FINIDR, 2002. ISBN 80-86682-01-3. 80-86682-00-5.
4. ČIHÁK, DRSC., prof. MUDr. Radomír, prof. MUDr. Rastislav DRUGA, DRSC. a prof. MUDr. Miloš GRIM, DRSC. *Anatomie 3: Třetí, upravené a doplněné vydání*. Svazek I-Nauka o cévách. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
5. BÍNA, Petr a František VYCHODIL UPRAVIL. Schéma a rozměry erytrocytu. In: Wikiskripta: Ery-schema [online <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:>]. 2014 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Ery-schema.png>
6. ROKYTA, DRSC., FCMA, prof. MUDr. Richard, ed. *Fyziologie: Třetí, přepracované vydání*. Třetí. Praha: Galén, 2016. ISBN 978-80-7492-238-1.
7. PENKA, CSC, prof. MUDr. Miroslav a MUDr. Eva TESAŘOVÁ A KOLEKTIV. *Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
8. FABER, CSC., prof. MUDr. Edgar, ed. *Základy hematologické diagnostiky: druhé, přepracované vydání*. Druhé. Praha: Mladá fronta, 2015. ISBN 978-80-204-3742-6.
9. HILLMAN, M.D., ROBERT S., KENNETH A. AULT, M.D., MICHEL LEPORRIER, M.D. a HENRY M. RINDER, M.D. *Hematology: IN CLINICAL*

- PRACTISE*. Fifth edition. United States: The McGraw-Hill Companies, 2010. ISBN 978-0-07-162699-6.
10. VOGELSANG, Georgia. CFU-E, BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM. In: *American Society of Hematology: Helping hematologists conquer blood diseases worldwide* [online<http://imagebank.hematology.org/image/9924/c>]. Washington: Copyright, 2017 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://imagebank.hematology.org/image/9924/cfue-bfue-cfugm-cfugemm?type=upload>
  11. *American Society of Hematology: The Hematology Atlas revision* [online<http://imagebank.hematology.org/image/60298/>]. Washington: Copyright, 2016 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://imagebank.hematology.org/image/60298/basophilic-normoblasts?type=atlas>
  12. KOZÁK A KOLEKTIV, MUDr. Tomáš, HOUDEK, PhDr. Lubomír, ed. *Vnitřní lékařství díl IIIb: Hematologie*. Praha: Galén, 2001. ISBN 80-7262-085-1.
  13. JÍLKOVÁ, MUDr. Helena. *Transfuzní lékařství*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009. ISBN 978-80-7395-151-1.
  14. *Microbiology and Immunology On-line* [online<http://www.microbiologybook.org/>]. University of south Carolina: [pathmicro.med.sc.edu](http://pathmicro.med.sc.edu), 2006 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www.microbiologybook.org/>
  15. DANIELS, Geoff. *Human Blood Groups*. Second edition. Blackwell Science, 2002. ISBN 0-632-056460.
  16. VYMĚTALOVÁ, Mgr. Veronika. *Biologie pro biomedicínské inženýrství*. České vysoké učení technické v Praze: Česká technika- nakladatelství ČVUT, 2008. ISBN 978-80-01-04013-3.
  17. ŘEHÁČEK, MUDr. Vít a MUDr. Jiří MASOPUST A KOLEKTIV. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.

18. JÍLEK, CSC., PharmDr. Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně.* 4., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4822-1.
19. HAMPLOVÁ A KOL., MUDr. Lidmila. *Mikrobiologie, Imunologie, Epidemiologie, Hygienu: pro bakalářské studium a všechny typy zdravotních škol.* Praha: TRITON, 2015. ISBN 978-80-7387-934-1.
20. VODIČKOVÁ, Věra. Imunoglobulin: Struktura imunoglobulinu. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:I>. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2010 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:IMUNOGLOBULIN.png>
21. Krevní skupiny. *Genetika-Biologie* [online]. MUDr. Antonín Šípek jr., 2014 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/krevni-skupiny>
22. PENKA, CSC., prof. MUDr. Miroslav a MUDr. Eva TESAŘOVÁ A KOLEKTIV. *Hematologie a transfuzní služba II: Transfuzní lékařství.* Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.
23. HUBENÁ, Soňa. *Antigenní systém erytrocytů, vyšetřovací metody, výskyt antigenů u dárců krve ve Fakultní nemocnici.* Hradec Králové., 2007. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové katedra biologických a lékařských věd. Vedoucí práce MUDr. Vít Řeháček.
24. KUBISZ. DRSC. A KOLEKTIV, prof. MUDr. Peter. *Hematológia a transfuziológia: Učebnica.* Bratislava: Grada, 2006. ISBN 80-8090-000-0.
25. DANIELS, Geoff a Imelda BROMLOW. *Essential guide to blood groups.* Blackwell Publishing, 2007. ISBN 978-1-4051-5349-2. 1-4051-5349-0.
26. OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka.* Nové přepracované. Praha: Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2109-8.
27. KOŠTÁLOVÁ, Helena. *OSTATNÍ LIDSKÉ KREVNĚ SKUPINOVÉ SYSTÉMY ERYTROCYTŮ.* Hradec Králové, 2012. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI

KRÁLOVÉ Katedra biologických a lékařských věd. Vedoucí práce MUDr. Vít Řeháček.

28. INDRÁK A KOLEKTIV, prof. MUDr. Karel, ALUŠÍK, CSC., doc. MUDr. Štefan a MUDr. Magdalena LEJSKOVÁ, ed. *Hematologie: Postgraduální klinický projekt*. Praha/Kroměříž: TRITON, 2006. ISBN 80-7254-868-9.
29. SCHARBERG, E. A., E. RICHTER a P. BUGERT. Red cell antigen testing. *ISBT Science Series*. [online]. International Society of Blood Transfusion, 2015, 10(Suppl. 1): 5-11. DOI: 10.1111/voxs.12134. ISBN 10.1111/voxs.12134. [cit. 2015-09-30]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/voxs.12134>
30. MASOPUST, MUDr. Jiří a MUDr. Martin PÍSAČKA. *Praktická imunohematologie: Erytrocyty*. Praha: Mladá fronta, 2016. ISBN 978-80-204-3740-2.
31. Metody molekulární biologie: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat. Biologie a genetika pro bakaláře: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat [online]. Brno: Eva Bártová, 2014 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: [http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody\\_molekularni\\_biologie&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz)
32. KORABEČNÁ, Marie. *Aplikace molekulární genetiky v klinické praxi*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-844-1.
33. SCHARBERG, E. A., E. RICHTER a P. BUGERT. Red cell antigen testing. *ISBT Science Series*. [online]. International Society of Blood Transfusion, 2015, 10(Suppl. 1): 5-11. DOI: 10.1111/voxs.12134. ISBN 10.1111/voxs.12134. [cit. 2015-09-30]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/voxs.12134>
34. PEYRARD, T. Molecular tools for investigating immnohaematology problems. *ISBT Science Series*. [online]. 2015, 10(Suppl 1), 31-38. DOI: 10.1111/voxs.12165. [cit. 2016-02-06]. Dostupné také z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/voxs.12165/abstract>



35. VELDHUISEN, B., C. E. VAN DER SCHOOT a M. DE HAAS. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sanguinis* [online]. 2009, 97, 198-206 [cit. 2016-02-14]. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01209.x. ISBN 10.1111/j.1423-0410.2009.01209.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1423-0410.2009.01209.x>
36. FINNING, K. a R. BHANDARI. Evaluation of red blood cell and platelet antigen genotyping platforms (ID CORE XT / ID HPA XT) in routine clinical practice. *Blood Transfusion* [online]. 2015, 1-8 [cit. 2016-02-12]. ISSN 1723-2007. Dostupné z: <http://www.bloodtransfusion.it/articolosing.aspx?id=000760>
37. MOULDS, Joann M. Future of Molecular Testing for Red Blood Cell Antigens. *Clinics in laboratory medicine*. [online]. 2010, 30(2), 419-29. ISBN 10.1016/j.cl.2010.02.004. [cit. 2016-02-13]. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271210000107>
38. *BioArray Molecular: Immunohaematology* [online]. Prague: Immucor, 2013 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: [https://www.uvn.cz/attachments/3018\\_11\\_smallridge\\_BioArray%20Prague%20Nov%202103\\_3\\_CZ.pdf](https://www.uvn.cz/attachments/3018_11_smallridge_BioArray%20Prague%20Nov%202103_3_CZ.pdf)
39. BIOARRAY SOLUTIONS. *Immucor PreciseType™, HEA: Molecular Beadchip test* Warren, 2014. Briefing Document for the Blood Products Advisory Committee. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/BloodProductsAdvisoryCommittee/UCM389146.pdf>
40. BIOARRAY SOLUTIONS, LTD. *HEA BeadChip™ Kit*. USA: BioArray Solutions, 2012, 24 s. P/N 190-00210 Rev G.
41. LANDOVÁ, PH.D., Ing. Ludmila. ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE-VOJENSKÁ FAKULTNÍ NEMOCNICE PRAHA ÚSEK CENTRÁLNÍCH LABORATOŘÍ ODDĚLENÍ HEMATOLOGIE A KREVNÍ

- TRANSFUZE. *Standardní operační postup: Izolace DNA*. Praha, 2015. Kód SOP/Vyš/050/v01.
42. BENEŠ, David. *Párová kompatibilita primerů* [online]. [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: [http://sosik.zam.slu.cz/multipcr/MultiPCR\\_popis.pdf](http://sosik.zam.slu.cz/multipcr/MultiPCR_popis.pdf)
  43. POSPÍŠILOVÁ, PHD., prof. RNDr. Šárka, Ing. Dana DVOŘÁKOVÁ, CSC. a Prof. MUDr. Jiří MAYER, CSC. *Molekulární hematologie*. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7262-942-8.
  44. LANDOVÁ, PH.D., Ing. Ludmila. ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE - VOJENSKÁ FAKULTNÍ NEMOCNICE PRAHA ÚSEK CENTRÁLNÍCH LABORATOŘÍ ODDĚLENÍ HEMATOLOGIE A KREVNÍ TRANSFUZE. *Standardní operační postup: Genotypizace krevně skupinových znaků u dárců krve*. Praha, 2015. Kód SOP/Vyš/051/v01.
  45. BANERJEE, PHD, Sukanta, Nick MAIORIELLO, Kristen SNAGUSKI, Kevin TRAINOR, Tasmia SHARIFF a Ruth HUANG. Immunocor BioArray HEA BeadChip test as tool for transfusion management of sickle cell patients: A retrospective analysis of filed performance of the assay [onlinefile:///C:/Users/lenka/Downloads/2012-SCD%20]. In: . Warren: Immucour gamma, s. 1 [cit. 2017-04-29]. DOI: file:///C:/Users/lenka/Downloads/2012-SCD%20HEA%20Poster%2022FEB12.pdf. Dostupné z: file:///C:/Users/lenka/Downloads/2012-SCD%20HEA%20Poster%2022FEB12.pdf

## 12 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Erytrocyt [5] .....	11
Obrázek 2 Vývojová stádia erytrocytu [9] .....	12
Obrázek 3 Základní kmenová buňka CFU GEMM a progenitory BFU-E a CFU-E [10].....	12
Obrázek 4 proerytroblast, B – bazofilní erytroblast, C – ortchromní erytroblast, D - retikulocyt barvení A/B/C barvení Giemsa-Romanowski, D supravitální barvení [11].....	14
Obrázek 5 Struktura imunoglobulinu [20] .....	16
Obrázek 6 Tabulka ABO systému [22] .....	18
Obrázek 7 Tabulka krevních systémů [23] .....	19
Obrázek 8 Zastoupení krevních skupin dle populace [22] .....	19
Obrázek 9 Komplexy Rh [23].....	22
Obrázek 10 Procentuální zastoupení v populaci [25] .....	23
Obrázek 11 Procentuální zastoupení v populaci [25] .....	24
Obrázek 12 Procentuální zastoupení v populaci [25] .....	26
Obrázek 13 Geny a fenotypy systému Lewis [22] .....	28
Obrázek 14 Ukázka BeadChipu [34] .....	42
Obrázek 15 Jednotlivé fáze testování [40].....	44
Obrázek 16 Umístění vzorků [40] .....	47
Obrázek 17 Pozice rotoru dle pozic vzorku [40].....	47
Obrázek 18 Sejmутí čipu mikroskopem [45] .....	52
Obrázek 19 Obrázek čipu [34] .....	57
Obrázek 20 Genotypizace I .....	59
Obrázek 21 Genotypizace II.....	59
Obrázek 22 Výsledek fenotypu .....	60
Obrázek 23 Výsledek fenotypu II .....	61

Obrázek 24 Genotypizace III.....	63
Obrázek 25 Genotypizace IV .....	62
Obrázek 26 Výsledek fenotypu III .....	63
Obrázek 27 Výsledek fenotypu IV .....	64
Obrázek 28 Graf polymorfismu vzorku 16114588.....	65
Obrázek 29 Graf intenzity I.....	66
Obrázek 30 Graf intenzity II .....	67
Obrázek 31 Graf intenzity III.....	67

## 13 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Znaký pro Erytrocytární antigeny v metodě BeadChip [40] .....	42
Tabulka 2 Příprava Master Mix-množství použitých reagentů [44] .....	49
Tabulka 3: Výsledky jednotlivých alel [41] .....	53